GT198 蛋白是抗癌化药和抗癌草药的靶点

庞峻峰[1]，高洁[2]，张立勇[3]，Nahid F. Mivechi[1]，柯蓝[1,4*]

1. 奥古斯塔大学癌症中心，佐治亚医学院，美国佐治亚州奥古斯塔。2. 阿拉巴马大学伯明翰分校临床诊断科学系，美国阿拉巴马州伯明翰。3. 匹兹堡大学外科系，美国宾夕法尼亚州匹兹堡。4. OnkoTarget 生物公司，美国佐治亚州奥古斯塔。

【**注解：**由于含有中草药信息，此文是作者对已发表的英文文章的中文翻译。内容以英文原文为准。图与补充材料未翻译仍为英文。引用时请引用版权为 CC-BY 的英文原文：Pang J, Gao J, Zhang L, Mivechi NF and Ko L (2021) GT198 Is a Target of Oncology Drugs and Anticancer Herbs. Frontiers in Oral Health 2:679460. DOI: https://doi.org/10.3389/froh.2021.679460】

摘要：肿瘤血管生成是癌症的一个特征。一些抗血管生成的抗癌药物已被证明临床有疗效。我们之前的研究显示，在包括口腔癌在内的人类实体瘤中，GT198 蛋白（基因符号 *PSMC3IP*，又称为 Hop2）是一个诱导血管生成的癌蛋白。本研究结果表明，十几种临床抗癌化疗药物，和几种临床成功的抗癌草药，都能直接抑制 GT198 蛋白靶点。GT198 是一个能与 DNA 结合的 DNA 修复蛋白。利用体外 DNA 结合法检测 GT198 活性，我们测试了 129 个美国 NCI 收集的临床抗癌化疗药物。发现体外直接抑制 GT198 的化药包括但不限于米托蒽醌、多柔比星（阿霉素）、紫杉醇、依托泊苷、放线菌素 D 和伊马替尼（格列卫）。紫杉醇和依托泊苷具有较高的结合亲和力，而多柔比星由于竞争性抑制 GT198，具有较高的结合效力。由于 GT198 与 DNA 拓扑异构酶有蛋白序列同源性，而 DNA 拓扑异构酶是过去认为的药物靶点，因此，GT198 蛋白很可能是个以前未被认知的药物新靶点。为了寻求更高效的 GT198 抑制剂，我们进一步测试了几种抗癌草药的提取物。发现具有高亲和力和高效力的阳性抑制草药都是临床上已经有成功历史的抗癌草药，包括牙买加的多香果（Allspice）、中国的皂角刺（*Gleditsia sinensis L.*），和厄瓜多尔的 BIRM。我们使用有机化学方法对多香果进行了部分纯化，证明用 GT198 为靶标，以体外 DNA 结合法追踪测活，可以高效快速纯化天然产物。综上表明，此项研究揭示了 GT198 是多种抗癌化药的新靶点。这项研究还提供了一个鉴定化合物与纯化天然产物的优异药物靶标。特别关键的是，这项研究为快速分离高效低毒的抗癌中草药提供了绝佳机会。

关键词：肿瘤血管生成，抗癌靶点，抗癌中草药，GT198 癌蛋白，口腔癌

基金项目：佐治亚州癌症联盟授予柯蓝的杰出癌症学者奖；美国国立卫生研究院授予 Nahid F Mivechi 的项目基金（CA132640）。
*通讯作者：Lan Ko（柯蓝），博士，ORCID 0000-0002-0089-9090，https://onkotarget.com/，从事癌症与炎症的研究和天然产物药物开发。E-mail: lan-ko@outlook.com

1. 引言

血管生成是多种人类实体肿瘤的特征 [1,2]。针对肿瘤血管生成的靶向药物已被证明具有很强的疗效 [3-5]。越来越多的证据表明，肿瘤组织中的血管并非正常组织中的血管，相反，它们是肿瘤发生发展的真正起因 [6-9]。在肿瘤组织中，血管生成中的新生血管本身是癌变恶性的 [10]。

控制血管生成的核心关键是周细胞 [11]。周细胞位于毛细微血管壁上并在刺激下启动血管生成 [12]。周细胞属于干细胞或祖细胞，能够分化成各种其它细胞系 [13]。正常的周细胞在胚胎发育或成人组织修复过程中可分化为新生的组织 [11-13]。然而，这一过程在肿瘤中被劫持了，其中诱导血管生成的周细胞是恶性的 [14]，并且它们的细胞分化受到了阻碍。肿瘤血管增生中的周细胞脱离微血管壁、迁移到组织中、并过度生长成为未分化的肿瘤细胞 [10]。肿瘤中具有迁移行为的周细胞以前也曾有报导 [15]。由周细胞衍生出来的围绕在血管外的肿瘤细胞也被描述为血管生成拟态 [6,16,17]。多项证据表明，肿瘤细胞的持续生长是由于癌干细胞源源不断的补充 [13]，而癌干细胞包含周细胞 [11,18]。

为了抑制肿瘤血管生成，许多抗血管药物制剂已被开发 [19,20]。多数是激酶抑制剂或 VEGF 通路抑制剂 [21,22]，用于抑制血管生长。由于肿瘤血管生成拟态经常缺乏血管内皮细胞，这些药物有可能会出现耐药性 [16]。因此，靶向周细胞可以更特异地抑制肿瘤血管生成，以克服耐药性。我们和其他学者在之前曾鉴定了名为 GT198（基因符号 *PSMC3IP*，别名 Hop2）的 DNA 修复癌蛋白 [10,23-25]。GT198 蛋白在肿瘤血管中周细胞上过量表达，但在静止期的正常周细胞中却无表达 [10]。在这项研究中，我们的结果表明 GT198 蛋白是一个很合适的药物靶点，直接抑制 GT198 蛋白的药物包括已批准上市的多种肿瘤化疗药，和一些对人类肿瘤已有很好疗效的抗癌草药。

GT198 基因最初被发现克隆时，是一个调控基因表达的转录辅激活因子 [23,26]。人类 GT198 基因的种系突变存在于家族性早发乳腺癌和卵巢癌中 [27,28]。家族性卵巢疾病 [29]，和卵巢功能不足 [30-32]，也带有种系突变。GT198 基因复发的体细胞突变广泛存在于多种实体瘤的肿瘤微环境中 [27,33]。重要的是，GT198 突变导致其蛋白过量表达，可在血管生成的周细胞上及其产生的血管平滑肌细胞系中检测到。如乳腺癌的肌上皮细胞和脂肪细胞 [34]，卵巢癌的 Theca 细胞 [35]，以及前列腺和膀胱癌的肌成纤维细胞 [36]。在人口腔癌以及多种实体瘤中 [10]，和小鼠肿瘤中也发现了 GT198 高表达的周细胞 [37]。微环境中异常血管生成中的周细胞有可能是人类实体瘤发展的共同起源。

GT198 在周细胞中的作用可能与它在干细胞中的表达和功能有关 [10,33]。GT198 的整体表达类似于癌-睾丸抗原 （CTA），在胚胎、睾丸、癌症中含量高，而在正常成人组织中含量低 [10]。正常的干细胞分化时，GT198 的表达从拮抗的 GT198 剪接变体转换到其野生型 [33]。在人类肿瘤中，体细胞的突变导致产生过量剪接变体，从而可能阻断干细胞正常分化 [33]。的确，口腔癌中血管生成的周细胞产生了未分化的细胞 [10]。

GT198 蛋白是个小型的 DNA 结合蛋白二聚体，其单体只含有 217 个氨基酸 [23,33]。GT198 蛋白包括一个 N 端结构域、一个亮氨酸拉链二聚体结构域、一个能够与单链或双链 DNA 结合的 DNA 结合结构域 [24,33]，以及一个 C 端自我抑制结构域 [33]。许多使用 GT198 别名 Hop2 发表的生化研究表明，哺乳动物的 GT198 是一个关键的 DNA 修复因子，刺激同源 DNA 重组并调节减数分裂 [24,38,39]。更多的证据表明，GT198 是一个高度重要的细胞核功能控制因子。转录激活、DNA 修复中的重组、以及减数分裂中同源染色体的配对等过程，都需

要 DNA 链的打开和结合。因此，DNA 结合是 GT198 的一个关键功能。通过检测其 DNA 结合活性，就可以筛选 GT198 的抑制剂。

在这份报告中，我们扩展了以前的观察 [10]，进一步表明人口腔癌中的周细胞高表达 GT198。为了测试 GT198 是否能成为抑制血管的抗癌药靶点，我们利用体外 GT198 与 DNA 的结合试验，筛选了 129 种来自美国 NCI 的临床肿瘤药物。令人惊讶的是，我们发现了一系列化疗药物，包括多柔比星、米托蒽醌、紫杉醇、依托泊苷和格列卫都是 GT198 的直接抑制剂。而 GT198 很可能是一个以前未被发现的药物靶标。为了进一步寻求更强的 GT198 抑制剂，我们测试了一些在临床抗癌中有成功历史的抗癌草药。发现几种阳性草药包括牙买加的多香果（Allspice）、中国的皂角刺（*Gleditsia Sinensis L.*）和厄瓜多尔的 BIRM，都直接抑制 GT198，并且具有高亲和力和高效力的抑制。利用有机化学纯化方法对多香果进行了部分纯化，证实了通过测试 GT198 的抑制来监测天然产物纯化有着极大的可行性。综上所述，我们的研究揭示了 GT198 是多个现有抗癌化药和抗癌草药的一个新靶点。GT198 靶点的利用可能对未来化药鉴定和天然植物药纯化开辟了一个新方向。

2. 结果

2.1 血管生成中 GT198 阳性周细胞引发人类口腔癌

我们曾在多种人类实体瘤的早期病变中发现了 GT198 高表达的微细血管 [10,34-36]。比如在人类口腔癌中，GT198 蛋白高表达是肿瘤微环境中血管生成的一个明显标志（图 1A-B）。通过 GT198 免疫组化染色口腔癌病理切片，我们观察到最早的病变是 GT198 阳性周细胞，并且周细胞会分化成多种阳性后代细胞。起初，GT198 阳性周细胞发生于小群增生的血管中。做为对照，周围静止的血管则含有 GT198 阴性周细胞（图 1B）。其后，GT198 阳性周细胞的细胞浆体积增加，使毛细血管壁异常增厚（图 1B）。接下来，GT198 阳性周细胞从血管壁上游离出来，变成组织基质中的阳性结节。在这个阶段中，基质中由周细胞衍生的 GT198 阳性成纤维细胞也增加了。再之后，周细胞结节增殖形成肿瘤块，通常在肿瘤块中心包围着一个血管（图 1B）。这种肿瘤中的血管仍有功能，因为血管腔内含有红细胞。这一点与其他人的研究观察一致，即肿瘤产生了自己的血管 [6,16]。值得注意的是，过去经典描述中说肿瘤从上皮基底层发展而来，也仍然是可以观察到的现象。然而，在这种情况下，发生肿瘤的上皮细胞总是被 GT198 阳性血管所包围，这些血管带有血管平滑肌标志物 αSMA（图 1C）。产生肿瘤的上皮细胞也是 GT198 阳性，而附近的正常上皮细胞则是 GT198 阴性（图 1C）。因为周细胞是干细胞，可以补充上皮细胞基底层的祖细胞。因此，上皮细胞衍生的肿瘤，和血管与基质结节衍生的肿瘤，有可能都起源于血管生成的周细胞。这一点当使用 GT198 蛋白作为周细胞染色标记时就变得清晰。肿瘤起源于上皮和血管的两个不同概念现在就可以被调和，即肿瘤都起源于周细胞。 在肿瘤内发现了散在的 GT198 和 αSMA 双阳性细胞进一步支持肿瘤从血管起源的观点（图 1D 和补充图 1）。结果显示血管生成中增生的血管首先发展为早期肿瘤细胞，然后在肿瘤长大成熟后血管解体。上述结果与我们以前的研究一致 [10]，这些证据共同证明血管生成中的周细胞是人类口腔癌中的肿瘤起源。

2.2 肿瘤药物包括多柔比星和紫杉醇是 GT198 的抑制剂

GT198 表达是肿瘤血管生成的特异性标志。为了检验 GT198 抑制剂是否具有抗癌作用，我们首先选择临床上已成功的抗癌药进行了验证。为了能测量GT198在体外的直接抑制活性，我们开发了一种体外DNA结合试验。将GT198重组蛋白质粘附在96孔板上，在有药物抑制剂的条件下，检测其与生物素标记的DNA的结合能力。生物素标记的DNA含量可以通过链霉菌素-辣根过氧化物酶（HRP）偶联物和荧光法来检测（图 2A-B）。首先，用牛血清白蛋白 BSA 作为阴性对照，检测了 DNA 和 GT198 之间的结合半最大效应浓度为 EC_{50}=43 nM（图 2C）。这一结果也显示，结合饱和前的 DNA 浓度大约为 150 nM（图 2C），这是一个可以用于后续分析的最佳 DNA 浓度。此浓度可以得到最强的检测信号，同时允许最有效的药物竞争抑制。

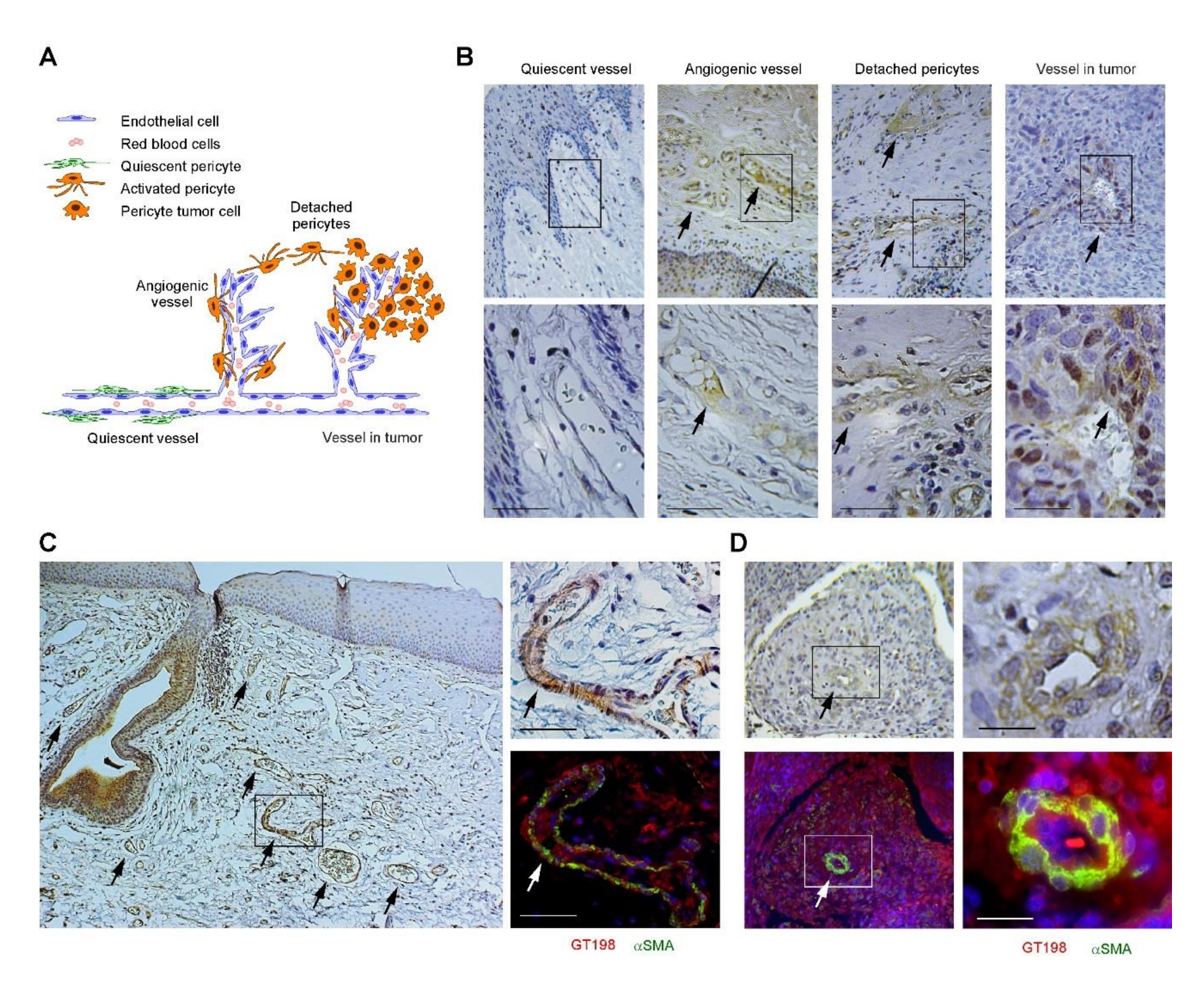


图 1. 人口腔癌中 GT198 阳性的血管生成。(A) 模型显示绿色为静止血管中的周细胞，橙色为血管生成和肿瘤中的血管周细胞。(B) 人口腔癌中 GT198 免疫组化染色。静止血管的周细胞为 GT198 阴性。 血管生成中的周细胞、游离的周细胞和肿瘤中的血管周细胞为 GT198 阳性。肿瘤围绕的血管有功能里面有红细胞。方框区放大于下面。(C) 在一个上皮性口腔癌中，血管生成的 GT198 阳性血管聚集于 GT198 阳性肿瘤上皮周围。相邻的切片用红色 GT198 和绿色的αSMA 进行免疫荧光双染，蓝色 DAPI 反染。(D) GT198 和αSMA 在同一患者口腔肿瘤中双染，显示肿瘤中心有一个血管。方框区放大于右边。扩展视野见补充图 1。箭头表示 GT198 阳性周细胞。免疫组化切片用苏木精反染。比例尺=100 微米。

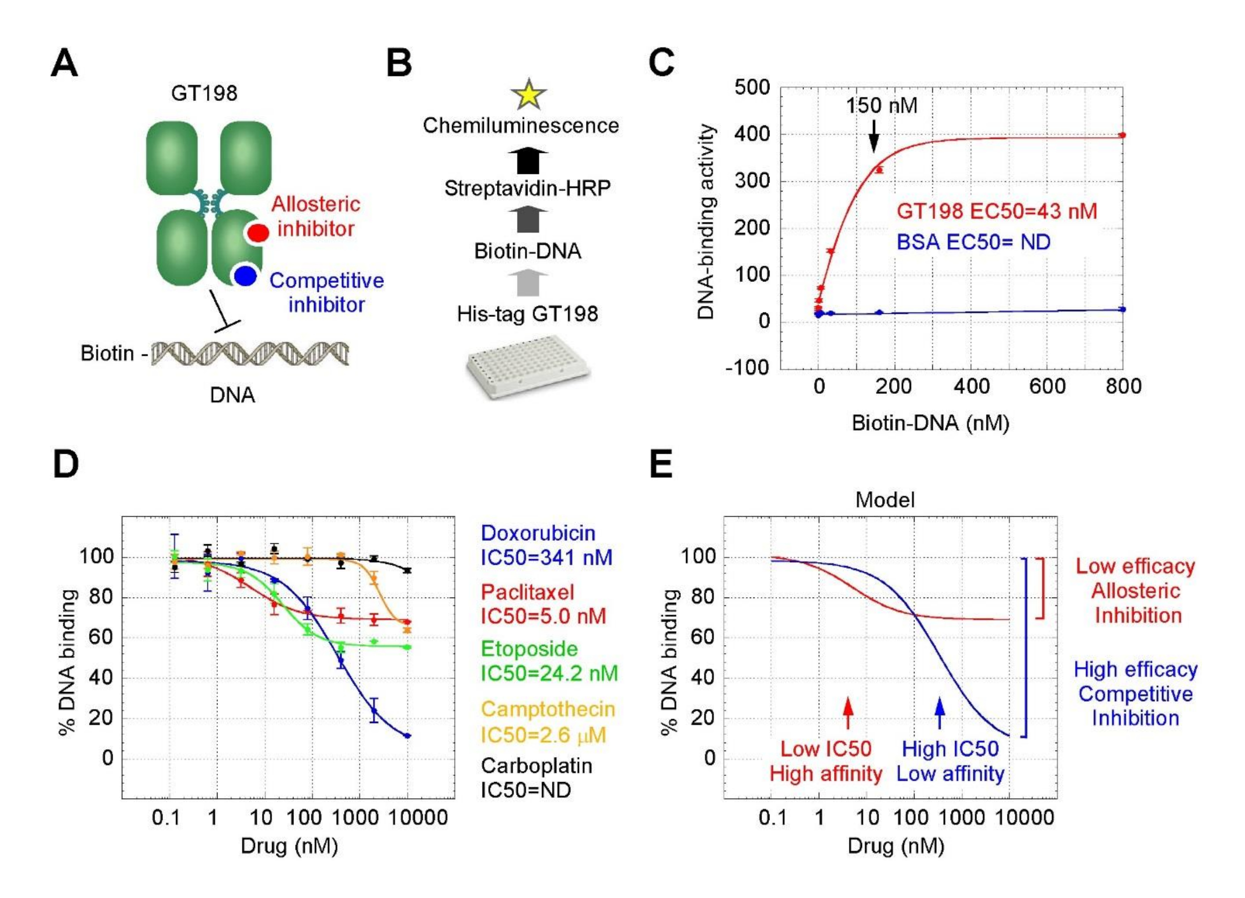


图 2. GT198 是抗癌化药的靶标。（A）模型显示竞争性与非竞争性药物抑制 GT198 二聚体与 DNA 的结合。(B) DNA 结合测活法流程图。(C) 以 BSA 为阴性对照，生物素偶联的 DNA 与 GT198 结合的曲线，EC_{50}=43 nM。(D) 临床药物对 GT198 与 DNA 结合的抑制曲线。IC_{50}s 通过 sigmoidal 曲线拟合测量。数据代表重复实验的平均值±标准误差。（E）结合亲和力与结合效力的比较模型。

之后，我们测试了多种抗癌化疗药物对 GT198 的抑制作用。测试半数抑制浓度 IC_{50} 是在药物梯度稀释浓度下和 150 nM 的 DNA 条件下来进行。出乎意料的是，发现许多抗癌化药都是阳性 GT198 抑制剂。多柔比星的亲和力较低（IC_{50}=341 nM），但抑制效力相对高，而紫杉醇（IC_{50}=5.0 nM）和依托泊苷（IC_{50}=24.2 nM）的亲和力高，但抑制效力较差（图 2D-E）。喜树碱的亲和力极差（IC_{50}=2.06 µM），卡铂完全不抑制 GT198（图 2D）。这是第一次利用这些药物的共同靶点 GT198 在体外交叉比较它们的结合特性。这一发现可能具有临床意义，因为紫杉醇或依托泊苷的临床耐受性和低毒性是由于它们的高亲和力 [40,41]；强效的多柔比星反映了它的高结合效力，虽然它毒性大些 [42]；与高度临床成功的紫杉醇相比，喜树碱的临床失败可能是由于其亲和力相当差的原因 [43,44]。

当比对同类药物之间的相似性时，GT198 是个真正的药物靶标就更加明显。在多柔比星类似物中，米托蒽醌（IC_{50}=187.4 nM）和柔红霉素（IC_{50}=149.9 nM）比起伊达比星（IC_{50}=362.4 nM）、表柔比星（IC_{50}=749.6 nM）和戊柔比星（IC_{50}=973.3 nM）来显示出更好的亲和力（图 3A）。米托蒽醌具有最高的效力，导致几乎完全的抑制。然而，它们的结合亲

和力都在几百纳摩尔的相近范围内。相比之下，喜树碱及其类似物伊立替康和拓扑替康的亲和力都一样差，或几乎不能抑制 GT198（图 3B）。

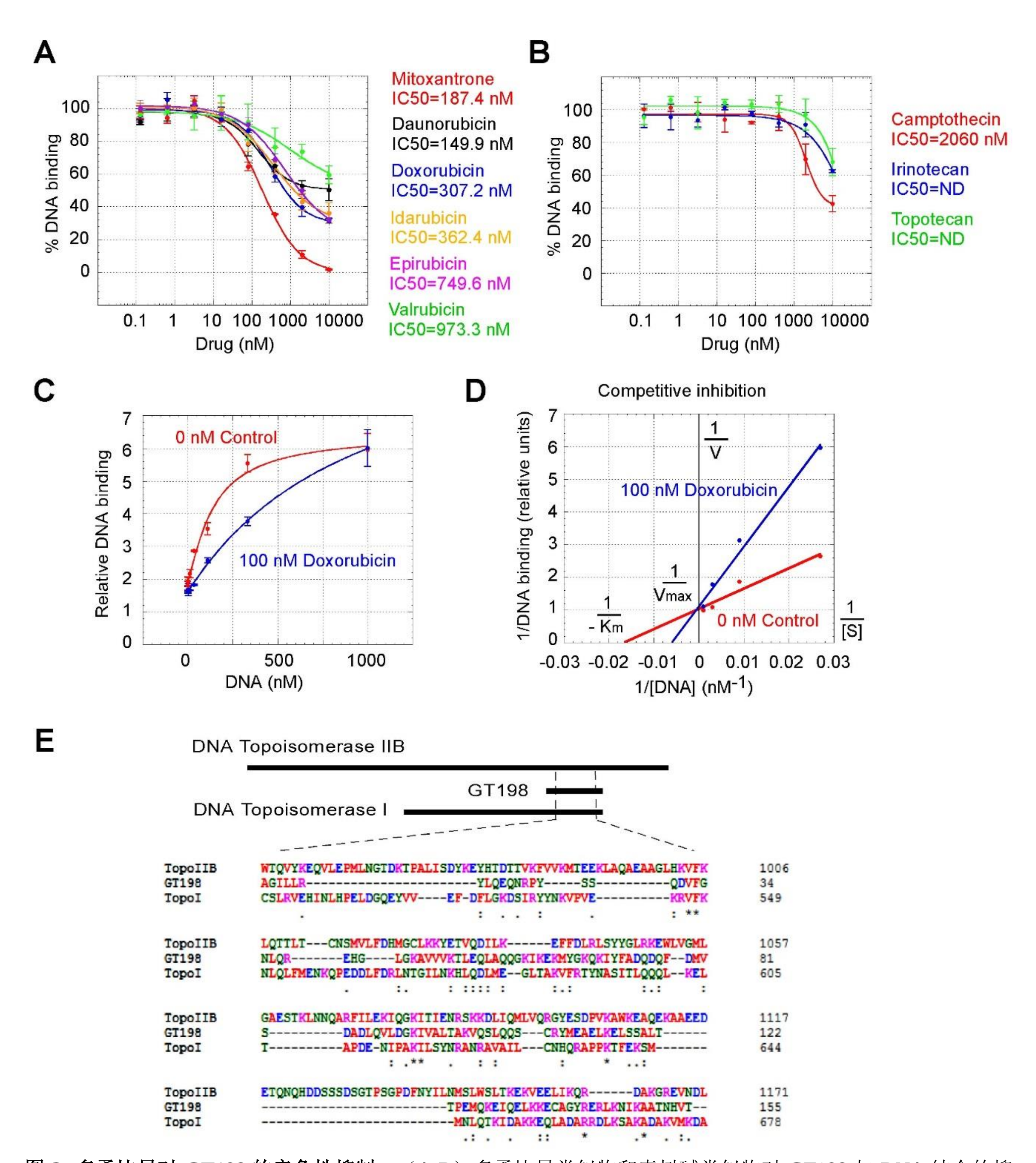


图 3. 多柔比星对 GT198 的竞争性抑制。（A-B）多柔比星类似物和喜树碱类似物对 GT198 与 DNA 结合的抑制曲线。IC50s 如图所示。(C) 在有（蓝色）与没有（红色）100nM 多柔比星时， DNA 与 GT198 的结合曲线。多柔比星作为竞争物，使结合曲线向右偏移。（D）在使用 C 组中高浓度数据点（37、111、333、1000nM）的平均值绘制的双倒数图中，恒定 Vmax 与多柔比星增加的 Km 表示竞争性抑制。（E）人 GT198 和 DNA 拓扑异构酶 I 和 IIB 之间的蛋白序列同源性（Clustal Omega）。星号表示相同的氨基酸残基，圆点表示同源的残基。全长比对见补充图 2。

我们进一步发现，多柔比星是 GT198 的一个竞争性抑制剂（图 3C-D）。随着 DNA 浓度的增加，多柔比星对 GT198 的结合被竞争性地抵消了（图 3C）。双倒数图分析显示 DNA 和多柔比星是竞争性结合（图 3D）。在 100nM 多柔比星与 0nM 对照图中，恒定的 Vmax 与增加的 Km 表明多柔比星与 DNA 在 GT198 分子上的结合位点相同。因此，多柔比星直接阻挡了 GT198 的 DNA 结合部位（图 2A 的模型）。作为一种竞争性抑制剂，多柔比星产生了抑制的高效力（图 2E 中的模型）。相反，我们在另一项研究中发现，紫杉醇是一种 GT198 的变构性抑制剂或非竞争性抑制剂 [45]。变构抑制可能导致相当不完全的抑制，造成较差的结合效力（图 2A 和 2D）。我们的结果提供了这样的解释：多柔比星由于结合效力高而成为一个强效的药物，但毒性也大。紫杉醇由于亲和力高但效力低成为药物敏感性好的药物。高亲和力与低毒性有正相关，因为较低的药物浓度已经足以产生抑制。

许多临床抗癌药物成为 GT198 的抑制剂，这最初是出人意料的但后来就不再令人惊讶。因为 GT198 与 DNA 拓扑异构酶 I 和 II 具有蛋白序列同源性（图 3E 和补充图 2）。DNA 拓扑异构酶是多柔比星、依托泊苷和喜树碱类似物以前已知的靶标 [46-48]。与 GT198 一样，DNA 拓扑异构酶是一个参与基因转录和重组的 DNA 结合蛋白。因此，蛋白序列的同源性进一步验证了 GT198 是一个以前未识的拓扑异构酶抑制剂的靶点。

2.3 从 NCI 肿瘤药物中鉴定 GT198 抑制剂

以上的发现促使我们进一步检测作为 GT198 抑制剂的其他抗肿瘤药物。利用上述 DNA 结合试验，我们从美国国家癌症研究所（NCI）的临床肿瘤药物集 VII 中筛选了 129 种抗肿瘤药物（表 1 和补充表 1）。图中选出 40 种药物来进行比较（图 4），只有部分阳性抑制剂分析了它们的 IC_{50} 值和结合效力（表 1）。确定的 GT198 抑制剂包括多柔比星类似物；紫杉醇和多西紫杉醇；依托泊苷和替尼泊苷。此外，阳性抑制剂还包括放线菌素 D、卡非佐米、西罗莫司（雷帕霉素）、伊马替尼（格列卫）、舒尼替尼、三氟胸苷和氨基乙酰丙酸（图 4 和表 1）。不是来自 NCI 药物集的雷公藤红素也被发现为阳性（表 1）。许多药物是阴性的，包括铂类抑制剂、甲氨蝶呤和长春新碱。在所有被测试为 GT198 抑制剂的药物中，米托蒽醌的抑制效力最高，紫杉醇的亲和力最好（表 1）[45]。

值得注意的是，许多药物在历史上都被发现有其他作用机制。例如，格列卫是一种 Abl 酪氨酸激酶的抑制剂。然而，在传统的药物开发过程中，从苗头化合物到先导化合物，再到候选化合物，经过多项筛选过程。通常，后面的步骤需要进行细胞和动物试验，而 GT198 蛋白是诱导细胞凋亡的一个显著的细胞毒性靶点 [33]，许多小鼠肿瘤模型中 GT198 蛋白也是高表达的 [10,37]。因此，格列卫可能在体内同时抑制酪氨酸激酶和 GT198，只是直到本研究才发现 GT198 也是其靶点。同样，本研究发现的其他一些 GT198 抑制剂中，也可能有一个以上的体内靶点。

2.4 抑制 GT198 的抗癌草药

为了寻求更好的既有高亲和力又有高效力的 GT198 抑制剂，我们检测了一些在治疗人类癌症方面有成功历史的草药。选择每种草药的理由在下面讨论中进行了详细阐述。两种最具

有潜力的抗癌草药是原产于牙买加的多香果（Allspice，*Pimenta dioica*）和原产于中国的皂角刺（*Gleditsia sinensis L.*, GSL）。通过乙醇提取并进行了 DNA 结合试验测试。与阴性对照的甘草相比，多香果（IC_{50}=1.77 ng/μl，效力=86%）和皂角刺（IC_{50}=0.54 ng/μl，效力=92%）都表现出很好的亲和力和效力（图 5A-B）。使用硅胶层析柱分析了洗脱组分的极性，我们发现两种植物的活性成分具有不同的极性（图 5C）。皂角刺活性成分比多香果活性成分极性大，这说明存在两种不同的 GT198 抑制剂，以后可以进行纯化。用皂角刺提取物通过 TUNEL 试验测试 HeLa 细胞凋亡时，检测到显著凋亡活性（图 5D）。这一结果证实了皂角刺提取物中的确存在细胞毒性成分。其他学者的证据表明，多香果也具有凋亡作用 [49]。

我们还测试了一套原产于台湾的抗癌药材，是含有四种树木的枝条（图 6A-B）。四种混合树枝是台湾有大量抗癌疗效见证的一剂抗癌中药。这些树是桑枝（*Morus australis*）、核桃枝（*Juglans regia L.*）、十大功劳（*Mahonia oiwakensis*）和降香（*Dalbergia odorifera*）。当单独测试时，我们发现所有四种提取物都对 GT198 有抑制作用。尽管在相同的浓度下，它们的活性比阳性对照的多香果低（图 6A）。这四种草药在亚洲都是常用草药，虽然每种草药的活性不高，但它们的组合可能会协同增强药效。

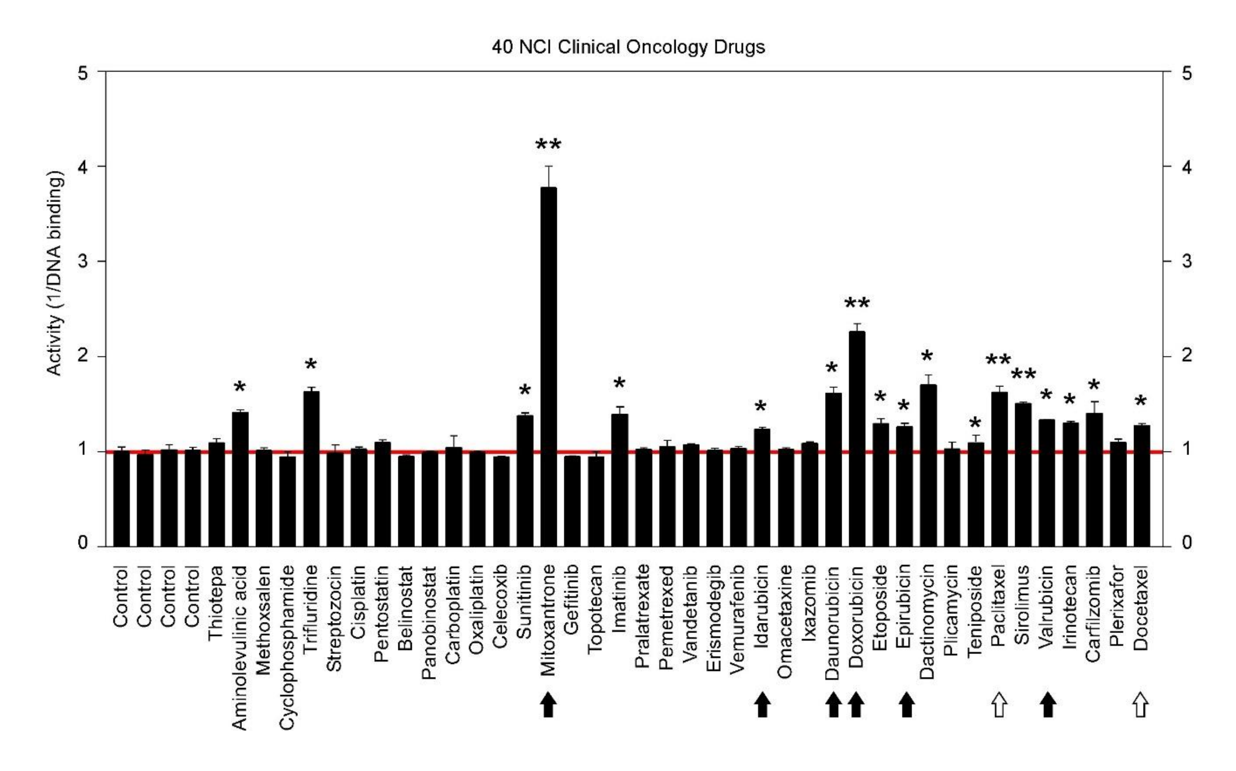


图 4. 临床抗肿瘤药对 GT198 的抑制。临床抗癌化药用 DNA 结合试验测活。抑制 GT198 的药物活性显示为 DNA 结合的相对倒数值。黑色箭头表示多柔比星类似物。白色箭头表示紫杉醇类似物。星形表示有显著活性增加。只选择显示了 40 种抗癌药，其余抗癌药结果见补充表 1。

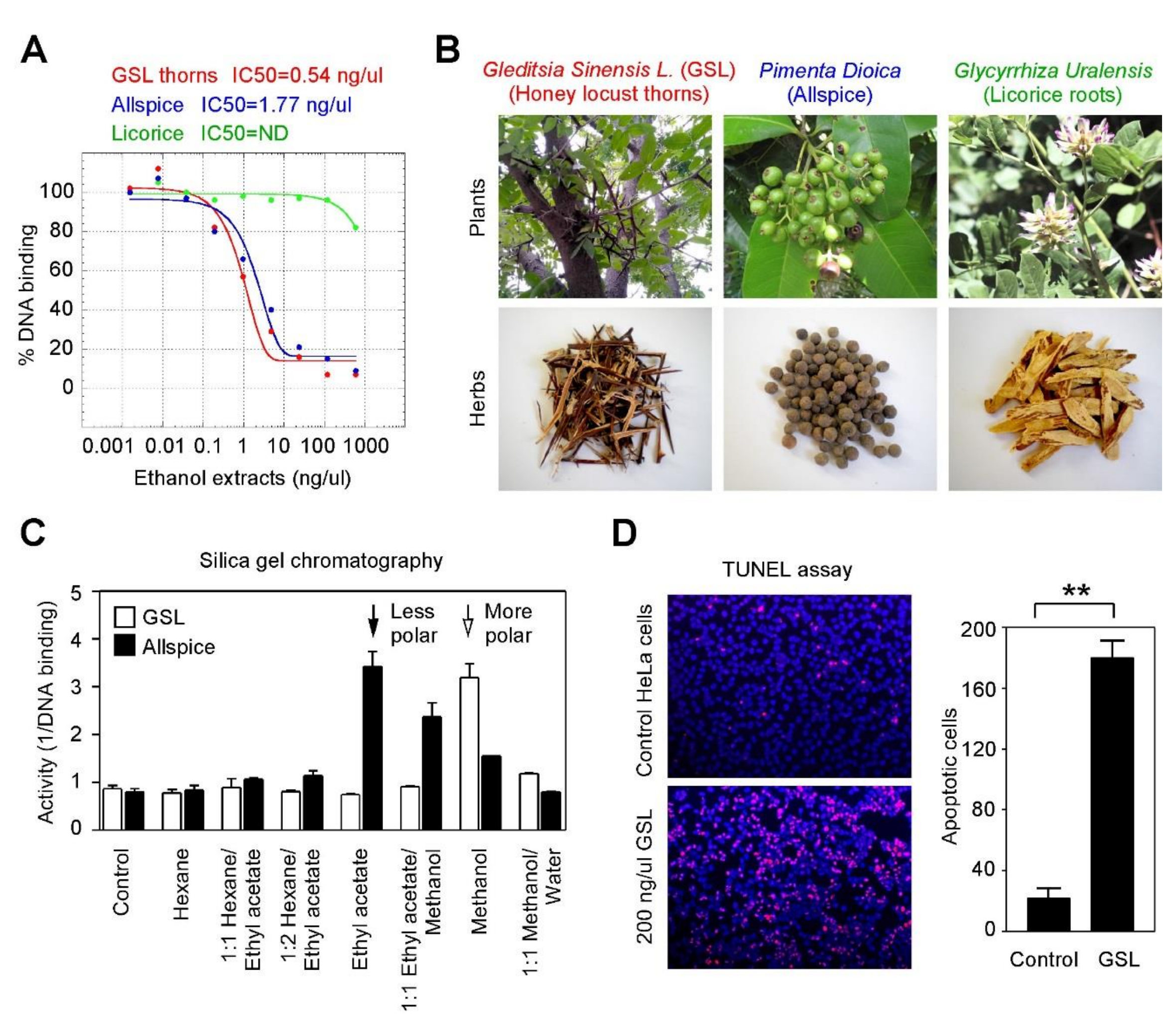


图 5. 抗癌草药对 GT198 的抑制。（A）皂角刺（GSL）和多香果（Allspice）提取物抑制 GT198 的 DNA 结合活性。甘草（Licorice）是阴性对照。IC50s 如图所示。(B) A 中使用的植物及相应药材的照片。 (C) 皂角刺和多香果的硅胶层析柱分离。箭头表示从非极性洗脱到极性时，它们的活性成分具有不同极性。(D) TUNEL 检测皂角刺在 HeLa 细胞中的凋亡活性。镜下阳性细胞定量表示如右图所示。

另一种被测试的草药是一种来自厄瓜多尔的商业化保健产品，名为 BIRM。BIRM 是生物免疫反应调节剂（Biological Immune Response Modulator）的缩写。BIRM 是厄瓜多尔植物 dulcamara（*Kalanchoe gastonis-bonnieri Raym*）干燥根部的水提取物。BIRM 提取物在抑制 GT198 方面显示出高效力以及高亲和力（IC_{50}=7.12 ng/μl）（图 6C-D）。除了大量人类癌症治疗的证据外，以前的研究表明，BIRM 在细胞和动物模型中通过调节雄性激素受体对抑制前列腺癌有效 [50,51]。本研究首次发现 GT198 是 BIRM 的直接靶点，可以解释的是，GT198 也是雄性激素受体通路上的转录辅激活因子 [23]。

非常重要的是，大多数确定的抗 GT198 抗癌草药也是已知的抗感染草药（表 2）。网上有大量关于多香果和 BIRM 治疗病毒和细菌感染的证据。皂角刺也被证明具有抗 HIV 病毒的作用 [52]，并在亚洲 2020 年被用于抗新冠大流行。由于感染中的急性炎症和癌症中的慢性炎症都同样会激活血管生成，抑制血管生成的 GT198 抑制剂或草药可能成为双重有效的抗癌和抗感染药物。

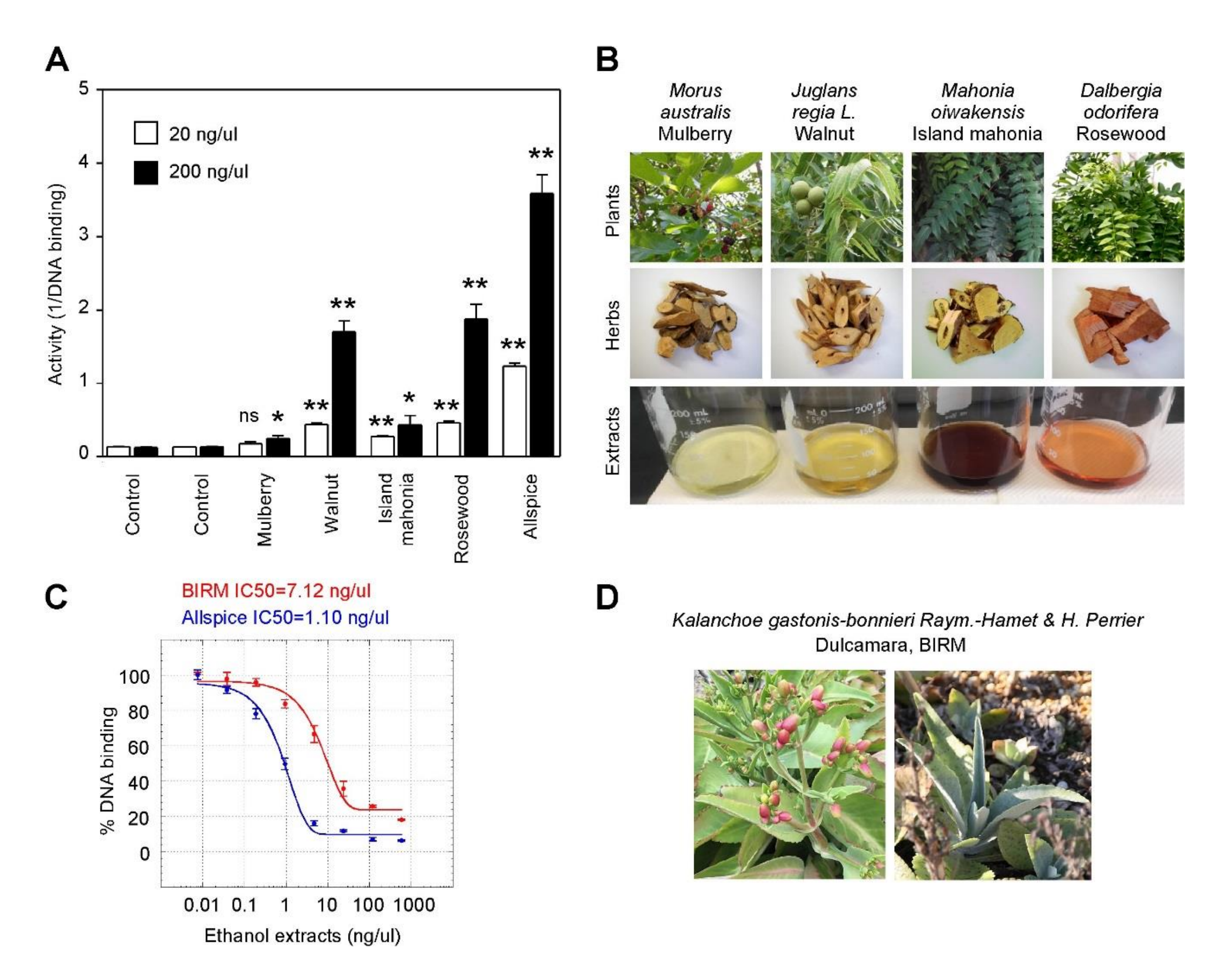


图 6. 抗癌草药商品对 GT198 的抑制。(A) 四种树枝的乙醇提取物抑制 GT198 的 DNA 结合。这四种树是台湾抗癌药中的桑枝、核桃枝、台湾十大功劳和降香。多香果为阳性对照。 (B) 四种植物及相应药材与 A 中检测的乙醇提取物照片。 (C) BIRM，是厄瓜多尔一种植物根提取物，可抑制 GT198 的 DNA 结合活性。多香果为阳性对照。IC50s 如图所示。(D) BIRM 植物的照片。

2.5 多香果的部分有机纯化

使用有机化学方法进行天然产物纯化，需要一个有效的体外测活方法来监测每个纯化步骤中的活性组分。上面描述的高度敏感的 DNA 结合测活试验是一个监测草药纯化的理想方法。我们首先用硅胶层析柱对多香果甲醇提取物进行分馏，得到有活性成分的第 8 馏分（图 7A）。通过制备型 HPLC 进一步分离，得到第 3 活性峰（图 7B）。 然后通过 Mono-Q 阴离子交换层析柱法对第 3 活性峰进行纯化。最高活性的组分在 60 mM NaCl 下被洗脱（图 7C）。通过反相 HPLC 进一步分析 60 mM NaCl 馏分，具有最高活性的成分为第 3 峰（图 7D）。根据进一步的分析，第 3 峰还不是很纯，需要进一步纯化才可获得单一化合物。

这些部分纯化结果已经证明了天然产物纯化的极大可行性。以 GT198 为药物靶点的 DNA 结合测活法可以进行有机纯化的监测。由于该检测方法速度快、灵敏度高，我们预计许多阳性药材可以通过纯化获得化学药物。或通过部分纯化去除有毒成分，成为更安全的中成药。

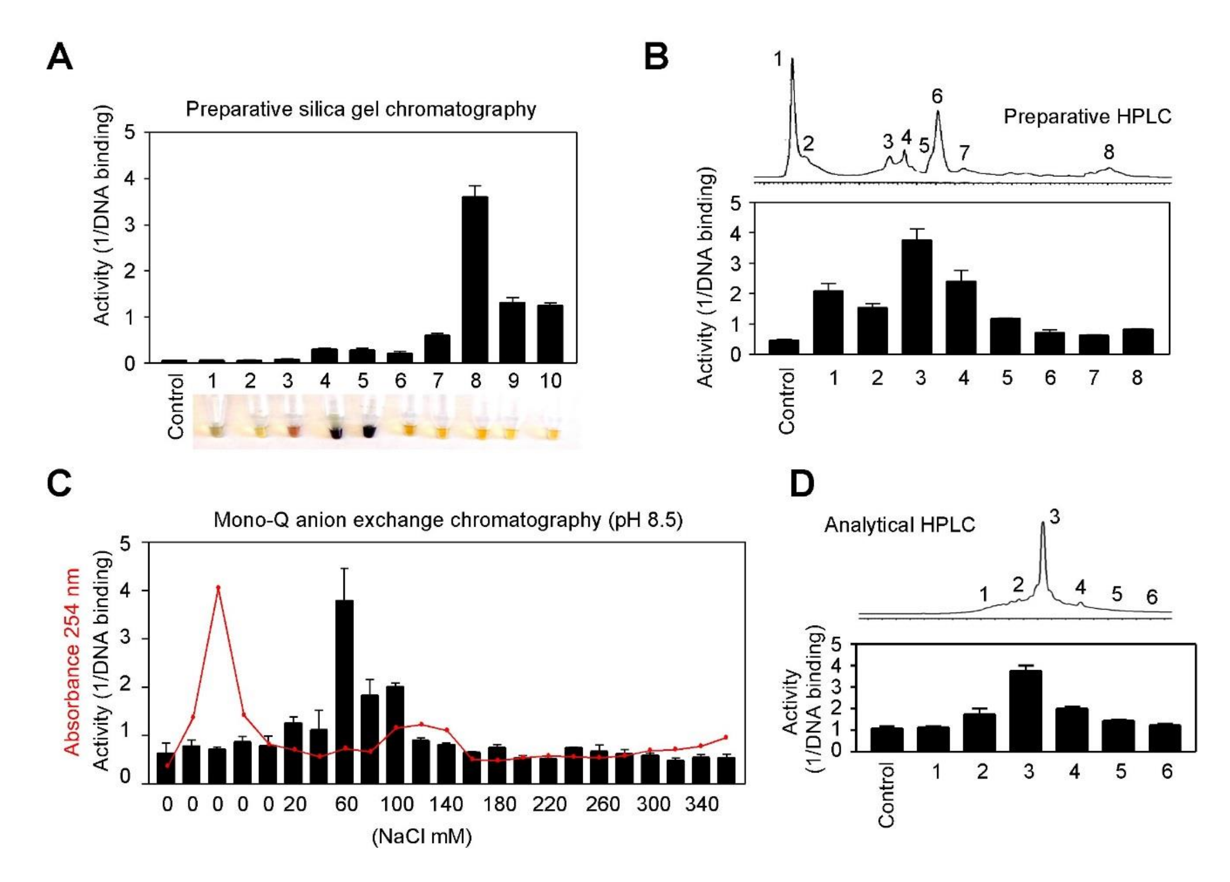


图 7. 部分纯化多香果。(A) 通过硅胶层析柱分离纯化多香果的乙酸乙酯提取物，得到第 8 号活性馏分。每个馏分的颜色显示于下。(B) 第 8 号馏分通过反相 HPLC 纯化，得到一个 3 号活性峰。(C) 3 号峰通过 Mono-Q 阴离子交换层析进一步纯化，活性馏分于 60mM NaCl 洗脱。(D) 通过反相 HPLC 分析 60mM 馏分，并对每个馏分进行活性测定。

3. 讨论

GT198基因最早于1995年首次报道。其cDNA部分序列的发现是由于当时筛选了17q21染色体位点上的乳癌基因 [53]， BRCA1 被发现后停止了位点上其它基因的研究。GT198 现在已经走出历史阴影，成为一个极重要的人癌症基因。NCBI 的原始基因符号是 *HUMGT198A*，后来改名为 *PSMC3IP*。人 GT198 全长蛋白最初被发现为基因调节的转录辅激活因子 [23]，其小鼠同源序列为 TBP 相互作用的蛋白 [54]。随后，由于其功能与酵母中 Hop2 蛋白相似，在减数分裂 [55]，和 DNA 修复 [24,39]，中的功能多以别名 Hop2 发表。如今，文献中使用的别名分别包括癌症研究中的 GT198，生化研究中的 Hop2 或 TBPIP，以及遗传学研究中的 *PSMC3IP*。

不同的研究重点反映了 GT198 的高度复杂功能，这在早期的发现中是不易统一的。随着证据的不断积累，GT198 的功能显得更加统一了。在细胞核生化功能方面，GT198 与 DNA 结合，因此它可以刺激转录、重组、DNA 修复和减数分裂 [56]。许多核蛋白与 GT198 相互作用，包括类固醇激素受体 [23]，和 DNA 修复因子 [56]。从癌症生物学的角度来看，GT198 能调节干细胞，刺激周细胞和血管生成 [34,36]，并能诱导细胞凋亡 [33]。从遗传学角度上看，

GT198 基因在癌症 [27,28,34]，和卵巢疾病 [29]，中携带种系和体系突变。我们目前的研究将 GT198 的功能扩展到一个新的层面。作为一个多种抗癌药的靶点，GT198 对阐明肿瘤发生机制提供了进一步的支撑 [57]。

当发现 GT198 是多种临床成功抗癌药的直接靶点之后（表 1），以前许多药物的作用机制就需要重新审视。我们发现，过去的许多证据确实可以与 GT198 的机制协调一致。GT198 蛋白与 DNA 拓扑异构酶 I 和 II 蛋白序列同源（图 3E），为多柔比星、依托泊苷、喜树碱及其同源物作为 GT198 抑制剂提供了直接解释。更加一致的是，多柔比星 [58]、依托泊苷 [59]，和喜树碱 [60]，也具有血管生成抑制的功能。多柔比星在临床心血管中的副毒作用也可能与血管周细胞的过度抑制有关。做为 GT198 抑制剂，放线菌素 D 具有细胞毒性并能调节 DNA 功能也可以解释 [61]。此外，紫杉醇的机制与抑制有丝分裂、细胞凋亡、血管生成都有关 [62]，紫杉醇的临床副作用与 GT198 的正常骨髓神经组织表达有正相关 [10,45]。由于具有血管生成抑制剂的功能，紫杉醇和多西紫杉醇是人类口腔癌的常用化疗药物。抑制血管生成也被证明是格列卫 [63]、氨基乙酰丙酸 [64]，和雷公藤红素 [65] 的活性。铂类 DNA 抑制剂不能直接抑制 GT198（图 2D 和表 1），可能是由于它们与 DNA 交联而不是 DNA 嵌入。上述证据共同表明 GT198 作为关键的癌蛋白，是迄今为止许多其它癌蛋白在功能上所无法比拟的。由于许多药物还没有被经过测试，未来可能还会发现更多的 GT198 抑制剂。

自古以来，草药是医药的主要形式，在大多数发展中国家现在仍在使用。许多草药学书籍中都描述了草药的大量复杂用途，历史上大约有 7 万种植物已被用作药物 [66]。与人工化学合成的非天然化合物相比，许多天然成分毒性较小。这是因为人类与环境中的植物长期共同进化的结果，人类已经适应了天然产物的分子成份。各种成功的临床抗肿瘤药物最初都往往来自于植物，如太平洋紫杉树中的紫杉醇和美洲鬼臼中的依托泊苷。

当从现有的肿瘤药物中发现了 GT198 抑制剂时，我们意识到它们多数抑制 GT198 的亲和力或效力双方面不能两全其美。我们推测抗癌草药中可能存在更完美的 GT198 抑制剂。这一判断是基于这样几点事实：GT198 是重要的癌症发生诱因；GT198 蛋白是一个药物靶标；抗癌草药临床治疗有着大量的历史见证。之后，我们选择并测试了一些具有成功治疗人类癌症历史的草药材。

皂角刺（*Gleditsia sinensis L.*）选自一本名为《本草纲目》的中国药书。该书是联合国教科文组织注册的遗产。图解本草纲目（紫图图书）中的文字改编自明代中药学家李时珍（1518-1593）的著作 [67]。在描述的 1200 多种草药中，只有皂角刺对所有生殖器官都有影响，包括乳腺、卵巢、睾丸、胎盘和子宫，这与 GT198 的功能特点正相关。书中描述，皂角刺对治疗妇女腹部肿瘤块有极效。如今，皂角刺在亚洲被广泛用作抗癌草药，而且皂角刺树木也被大量种植，用于中药抗癌。在 PubMed 中，大约有一百篇学术文献描述了对皂角刺的研究，包括针对乳腺癌和前列腺癌的抗癌活性 [68,69]，以及对肿瘤血管生成的影响 [70,71]。皂角刺的生物活性也有综述 [72]。

选择牙买加的多香果和厄瓜多尔的 BIRM 是由于它们有在南美洲临床治疗前列腺癌的历史。多香果以其绿色有机和保健益处众多而闻名，包括其抗病毒感染、抗氧化和增强免疫力的功能。过去牙科医生经常使用多香果进行口腔保健消炎防感染。我们学校的研究人员表明，多香果提取物 [49,73,74]， 和 BIRM [50,51]， 都含有活性成分能在小鼠模型中产生凋亡和抗癌功能。这两种草药都影响了前列腺癌中雄性激素受体的介导。由于 GT198 是一种雄激素受体介

导基因激活中的转录辅激活因子，我们测试并确认了 GT198 为多香果和 BIRM 的直接靶点（图 5A 和 6C）。

表 1. 抑制 GT198 的临床抗癌化疗药物

已经测试 IC_{50} 的药物显示 IC_{50} 和 2 μM 浓度时的效力为抑制百分比（%）。没有测试 IC_{50} 的药物只显示为有活性或非活性。连字符（-）表示 IC_{50} 未测。

药名	亲和力 IC_{50}	效力%	以前抑制机制
Mitoxantrone 米托蒽醌	187 nM	90%	拓扑异构酶
Daunorubicin 柔红霉素	149 nM	48%	拓扑异构酶
Doxorubicin 多柔比星	307 nM	61%	拓扑异构酶
Idarubicin 伊达比星	362 nM	56%	拓扑异构酶
Epirubicin 表柔比星	749 nM	50%	拓扑异构酶
Valrubicin 戊柔比星	973 nM	26%	拓扑异构酶
Paclitaxel (Taxol) 紫杉醇	5 nM	32%	微管
Docetaxel 多西他赛	-	活性	微管
Cabazitaxel 卡巴他赛	-	非活性	微管
Vincristine 长春新碱	-	非活性	微管
Etoposide 依托泊苷	24 nM	42%	拓扑异构酶
Teniposide 替尼泊苷	-	活性	拓扑异构酶
Camptothecin 喜树碱	2060 nM	30%	拓扑异构酶
Topotecan 拓扑替康	>2000 nM	4%	拓扑异构酶
Irinotecan 伊立替康	>2000 nM	10%	拓扑异构酶
Dactinomycin 放线菌素 D	-	活性	拓扑异构酶
Celastrol 雷公藤红素	350 nM	30%	广谱抑制
Carfilzomib 卡非佐米	-	活性	蛋白酶体
Sirolimus (Rapamycin) 雷帕霉素	-	活性	mTOR
Imatinib (Gleevec) 伊马替尼	-	活性	酪氨酸激酶
Sunitinib 舒尼替尼	-	活性	酪氨酸激酶
Trifluridine 三氟胸苷	-	活性	DNA 抑制剂
Aminolevulinic acid 氨基乙酰丙酸	-	活性	光动力
Carboplatin 卡铂	-	非活性	铂金 DNA 抑制剂
Cisplatin 顺铂	-	非活性	铂金 DNA 抑制剂

选择一种来自台湾的含有四种树枝的中草药进行测试，是因为这味中药在治疗人类结肠癌方面有大量的成功见证。中药书籍曾描述桑枝和核桃枝具有多种健康益处，而十大功劳和降香是历史悠久的著名抗癌药材。虽然它们在抑制 GT198 方面表现出的活性不如多香果（图 6A），但四者的联合可能具有协同增效的抗癌作用。其优点是这四种树枝的毒性都相对较小。

此外，我们同时测试了许多其他草药提取物作为阴性对照（表 2 和数据未显示），以确保检测到的活性不是由于从植物提取物造成的非特异假象。观察到的最高抑制灵敏度是在皂角刺提取物中， 可在 0.2 ng/μl 浓度下被检出。考虑到通常有千百种不同的分子存在于粗提物中，如果皂角刺的活性成分被纯化，预期的活性化合物亲和力可能相当好（IC_{50}<1 nM）。如果以毒性低为考虑重点，则多香果是一种无需纯化的最佳草药。因为它是一种西方广泛使用的绿色有机香料食品，而且对健康有益。

在研究拮抗 GT198 的草药时，发现了一个有重要性的现象，即所有阳性的抗癌草药也是抗炎抗感染草药（表 2）。事实上，多香果和 BIRM 的抗病毒和抗细菌活性比抗癌活性更突出而广为人知。2020 年，皂角刺和降香已被用于防治新冠流行。如果考虑到感染中的急性炎症和癌症中的慢性炎症共享相同的血管生成周细胞，在这两种情况下都过度表达 GT198，这一现象就可以解释而不会奇怪。炎症反应时，炎症信号通常激活周细胞干细胞，以便随后的生长和炎症反应。只是在慢性炎症和持续的周细胞激活时则会导致癌症。因此，属于 GT198 抑制剂类的药物将可能同时具有抗感染和抗癌作用。大多数肿瘤药物的用途只限于抗癌，原因是这些药物在药监局批准时，只限于在临床试验过的某种癌症范围内使用， 还没有试验炎症患者。我们目前的研究有助于推动已批准的抗肿瘤药物（表 1）在更多癌症和感染性炎症中的共同应用。这一努力能增加未来抗击新冠流行的药物，不仅使用草药，还可使用临床已批准的抗癌化药。因此，GT198 靶点蛋白对于未来开发双效抗癌抗炎药至关重要。

综上所述，我们扩展了以前的观察，并进一步显示血管生成周细胞在人类口腔癌中高表达 GT198。一组现有的抗癌化药被证明为 GT198 的直接抑制剂，包括米托蒽醌、多柔比星、紫杉醇、依托泊苷、放线菌素 D 和伊马替尼。同时，抑制 GT198 的草药也具有抗癌的成功历史。此研究还证实了用 GT198 为靶标来监测有机纯化天然产物的可行性。总之，这项研究揭示了 GT198 是多个现有抗癌药靶点的新机制。GT198 是一个化合物鉴定和天然产物纯化的药物新靶点。这项研究对加速开发高效低毒的抗癌抗炎药物将起到推动作用。

表 2. 抑制 GT198 的草药

抑制 GT198 的效力是用 120 ng/μl 的草药乙醇提取物测定的。抗癌和抗炎的临床证据表示为：+++，证据广泛；++，证据显著；+，存在证据；-，缺乏证据。

草药名 *拉丁名*	**亲和力 IC_{50}, 效力%**	**抗癌**	**抗炎**	**植物原产地**
皂角刺 *Gleditsia sinensis L.* (GSL)	0.54 ng/μl, 92%	+++	++	中国，韩国
多香果 *Pimenta dioica* （Allspice）	1.77 ng/μl, 86%	+++	+++	牙买加
BIRM (Dulcamara) *Kalanchoe gastonis-bonnieri*	7.12 ng/μl, 74%	+++	+++	厄瓜多尔
桑枝 *Morus australis*	弱阳性	+	++	中国，欧洲
核桃枝 *Juglans regia L.*	阳性	++	+	欧洲，亚洲
十大功劳 *Mahonia oiwakensis*	阳性	+++	+++	台湾
降香 *Dalbergia odorifera T. Chen*	阳性	+++	+	印度，南亚
甘草 *Glycyrrhiza uralensis Fisch*	阴性	-	+	中国
菊花 *Chrysanthemum x morifolium*	阴性	-	+	日本，中国

4. 实验方法

4.1 免疫组化

经过亲和纯化的 GT198 的多克隆兔抗体之前已经描述过 [23,34]。福尔马林固定石蜡包埋（FFPE）的病理切片经二甲苯和乙醇系列脱蜡和脱水后，在含有 0.05%Triton，pH 6.0 的 10mM 柠檬酸钠缓冲液中 90º C 下进行抗原修复 20 分钟。与 GT198 抗体（1:200）在 4º C 下孵育过夜。结合的抗体用生物素偶联的第二抗体和检测试剂（Abcam）来检测。然后切片再用苏木精进行对比染色。

人类口腔癌 FFPE 切片来自于匹兹堡大学癌症研究所的头颈癌 SPORE。样本尊照该机构 IRB 指南而获取，使用的是无法追溯识别受试者的人类癌症标本。本研究中使用的五个口腔癌标本的临床分期为：1）男性，56 岁，正常口腔粘膜，图 1B，静止期血管。2）男性，50 岁，T4N3M0，图 1B，血管生成的血管。3）男性，53 岁，T3N2M0，图 1B，脱落的周细胞。4）男性，65 岁，T2N1M0，图 1B，肿瘤内血管。5）男性，51 岁，T3N1M0，图 1C 为癌旁组织；图 1D 和补充图 1 为肿瘤组织。

4.2 临床抗癌化药

包含有 129 种临床抗癌化药的药物集 VII（4845 号和 4846 号板）来自于美国国家癌症研究所（NCI）的癌症治疗和诊断部门（DCTD）下属发展治疗项目组（DTP）。 每个药物的化学结构可以在 NCI 网站上用板号查到 https://dtp.cancer.gov/dtpstandard/platemap/index.jsp，药物也列在补充表 1 中。 96 孔板中的每个孔含有 20 μl 溶于 DMSO 的 10 mM 药物。除了 129 种 NCI 药物外，还有一些临床抗肿瘤药物是从奥古斯塔大学药房获得。

4.3 草药材料

皂角刺（*Gleditsia sinensis L.*）是皂角树干上的棘刺，来源于中国云南省。皂角刺的乙醇提取物干粉由云南昆明制药集团公司的药物研究所提供。原产地牙买加的干燥的多香果来自于美国华盛顿州的 World Spice Merchants 商店。BIRM 提取物的干粉来自于厄瓜多尔，由奥古斯塔大学的 Bal Lokeshwar 博士提供。含有桑枝、核桃枝、台湾十大功劳和降香的四种树枝抗癌中药来自台湾一家中药店。两种阴性对照药材甘草和菊花，来自中国一家同仁堂药材零售店（表 2）。药材的乙醇提取物用于 DNA 结合试验以确定其活性。皂角刺和多香果的甲醇提取物用于层析柱和 HPLC 有机化学纯化。草药提取物经过一夜的干燥，用分析天平称重，以 30 mg/ml 的浓度溶于 DMSO，并储存在-80ºC 冰柜。

4.4 His-tagged 重组 GT198 蛋白的纯化

全长的 GT198 蛋白有 217 个氨基酸 [23]。N 端和 DNA 结合域对其二聚体化和 DNA 结合是必不可少的。然而，我们以前曾报道过它的 C 端尾部（aa 181-217）会自我抑制降低其自身的 DNA 结合活性 [33]。在体内，GT198 的结合域应该被严加保护，直至被调控打开。对于

体外检测，去除自我抑制 C 端将使 DNA 结合和信号检测达到最佳值。因此，本研究使用了截除 C 端的 GT198（aa 1-180），以确保检测的高灵敏度。去除 C 端的潜在缺点是，某些药物如果需要结合 C 端的话，则可能无法被检测到。

在大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS 中表达 N 端 His-tag 标记的重组人 GT198 蛋白（aa 1-180），并通过 Ni-NTA-琼脂糖（Qiagen）纯化。具体方法如先前所述 [33]。GT198 蛋白质被 200 mM 咪唑洗脱后，用 Amicon YM-10 柱离心浓缩脱盐，加 50%甘油，并在使用前储存在-80°C。蛋白质浓度用蛋白质考马斯亮蓝染色浓缩液（Bio-Rad）和 2 mg/ml 牛血清白蛋白（BSA）标准液（Sigma）测定。

4.5 DNA 结合测活试验

体外结合测活试验使用 96 孔板，用化学荧光法检测生物素偶联的 DNA 与 GT198 的结合。在检测中使用单链引物 25-mer 生物素标记寡核苷酸 [Biotin]-cctggggttgctgaggtcctggcag，因为它足以结合一个 GT198 二聚体，为非序列特异结合。结合使用 MicroLite^{TM} 2+ 白色 96 孔板（Thermo Scientific，#7572）。每孔先加入含有 400 ng/孔的重组 His-tag GT198 蛋白和 5 μg/孔纯化 BSA（NEB）的溶液，体积为 50 μl，96 孔板在 37°C 烤箱中过夜干燥。一些只有 BSA 无 GT198 的孔被包括在其中作为阴性背景对照。由于背景非常低，所以不需要减去背景。每个实验点都使用重复双孔。每组实验重复 3 次。干燥的 GT198 涂层 96 孔板先用含有 5%的 BSA 的 TPBS（加了 0.1% Triton X-100 的 PBS）溶液封闭 1 小时以上。再加入 150 nM 生物素标记寡核苷酸和梯度稀释浓度的药物（0.128, 0.64, 3.2, 16, 80, 400, 2000, 10000 nM）或草药植物提取物（0, 0.0384, 0.192, 0.96, 4.8, 24, 120, 600 ng/μl）。药物配置使用结合缓冲液（20 mM TrisHCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 75 mM KCl, 0.5 mM MgCl2, 0.05% Triton X-100, 10%甘油, 1 mM dithiothreitol）并在 4°C 下进行结合 4 小时以上或过夜。结合后，室温下用 TPBS 溶液浸泡洗板换液三次，共 45 分钟。然后用含有 1 U/ml 浓度的链霉素偶合辣根过氧化物酶（streptavidin-conjugated HRP）（罗氏分子生化公司，#1089153）的 TPBS 在 4°C 下孵育 1 小时。并进一步用 TPBS 浸泡洗涤三次，每次 10 分钟，共洗 30 分钟后读板。读板前迅速加入 50 μl/孔的 ECL 检测试剂（Amersham Pharmacia Biotech，Western blot reagents），然后使用荧光分光光度仪通过化学荧法检测结合的生物素寡核苷酸。在 45 分钟内重复读板 3 次，通常第 2 次读板产生最一致的结果。完成实验的 96 孔板用 Bio-Rad 公司的蛋白质测定染料试剂染色，以评估平板上结合的 GT198 蛋白是否脱落。MicroLite^{TM} 2+板具有极好的蛋白结合能力，在反复洗涤步骤后不会丢失覆盖的 GT198 蛋白。

4.6 动力学数据分析

IC_{50} 值是半数抑制浓度，指对 DNA 结合有 50%抑制作用的药物浓度。IC_{50} 值是通过 Kaleidagraph 软件（Synergy 软件）使用非线性回归 sigmoidal 剂量-反应曲线（sigmoidal dose-response curve fit）拟合计算的。计算公式为 y = m1 + (m2 - m1)/(1 + (x /m3)m4)，其中 m1 是最小值，m2 是最大值，m3 是由 Kaleidagraph 计算的 IC_{50} 值，m4 是曲线中点的斜率。竞争性结合试验中 Vmax 和 Km 的分析是在双倒数图中进行的，使用四个高浓度数据点的平均值，省略倒数值偏离线性的低浓度点。见参考文献中的例子 [45]。双倒数图显示竞争性结合为恒定的

Vmax，在药物存在时 Km 增加；否则为非竞争性结合，在药物存在时 Vmax 减少，Km 恒定。一般来说，竞争性抑制剂直接与靶标的 DNA 结合表面阻断，并将 DNA 踢出。相比之下，非竞争性抑制剂结合在靶标上附近的一个部位，并诱导其蛋白质构象变化，以减少 DNA 与靶标的结合。竞争性抑制剂可能具有更高的结合效力。

4.7 草药成分的极性分析

硅胶具有高极性，可以与化合物发生强烈的相互作用。使用非极性溶剂到极性溶剂的梯度，不同极性的化合物则可以分别从硅胶柱上洗脱下来。将含有 60 mg 的皂角刺或多香果的 5 ml 甲醇提取物与 1.5g 高纯度、孔径 60 埃、70-230 目硅胶粉末（Sigma #288624）混合，并风干一晚。将结合的硅胶装入层析柱（Bio-Rad 公司，14 毫升柱子里装 3 毫升硅胶），用 6 毫升溶剂批量洗脱，以下括号内为极性指数。正己烷（0.1），1：1 正己烷和乙酸乙酯（2.2），1：2 正己烷和乙酸乙酯（3.0），乙酸乙酯（4.4），1：1 乙酸乙酯和甲醇（4.7），甲醇（5.1），1：1 甲醇和水（7.6）。洗脱出来的馏分被真空干燥，称重，在 DNA 结合试验中测试活性。

4.8 多香果的部分纯化

将多香果（50g）研磨成粉，在室温下用 1000ml 甲醇搅拌提取过夜。甲醇可溶部分用等体积的乙酸乙酯进行液液萃取。乙酸乙酯部分被进一步干燥，以便随后进行层析分析。提取的多香果（1.5 克）与硅胶结合，装入硅胶柱（3x30 厘米），先用正己烷-氯仿梯度洗脱，然后用乙酸乙酯和乙酸乙酯加 10%甲醇梯度洗脱。共收集了 10 个馏分（每个 50ml），活性最高的是 8 号馏分（图 7A）。该馏分被浓缩并通过制备性反相 HPLC（C18，4.6x150 cm，流速 0.5ml/min）进一步纯化，使用 5%甲醇水溶液到 100%甲醇的梯度，得到一个活性 3 号峰（图 7B）。此峰被干燥（600 µg）并通过 Mono-Q 阴离子交换层析柱（Bio-Rad HiTrap Q HP 柱，1ml）进一步纯化。交换柱在含有 95%甲醇、50mM NH4HCO3、pH8.5 的缓冲液中，用 1.2ml 梯度增加的 NaCl 浓度（0-360mM）对该柱进行梯度洗脱。所有的馏分在 A_{254} 测量吸光度并测定活性。最高活性馏分在 60 mM NaCl 下被洗脱（图 7C）。然后用反相 HPLC（Waters，C18，4.6x75mm，流速 0.5ml/min）分析 60mM 馏分，得到活性最高的 3 号峰（图 7D）。在每个步骤中，测试样品被干燥并溶解在 DMSO 或结合试验的结合缓冲液中，用以测活。

4.9 细胞凋亡 TUNEL 试验

培养 HeLa 细胞（ATCC，CCL-2）用含有 10%的胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 0.1 µg/µl 链霉素的 DMEM 细胞培养液。细胞在腔室载玻片中于 37ºC 的 5%二氧化碳环境下培养。先用 200ng/µl 皂角刺提取物处理细胞过夜，之后在-20ºC 用 100%甲醇固定 10 分钟。然后在冰上用含 0.1% Triton 的 10mM 柠檬酸钠 pH6.0 的缓冲液浸泡 2 分钟，使细胞具有通透性。使用原位细胞凋亡检测试剂盒（In Situ Cell Death Detection Kit 罗氏）并按照制造商的方法进行 TUNEL 染色。简而言之，将准备好的细胞放在黑暗的 37ºC 温箱中，用 TMR-Red 标记的 dUTP 和末端转移酶溶液标记 1 小时，该溶液标记凋亡细胞中产生的 DNA 片段。用 PBS 清洗后，在荧光显微镜观察之前，用 DAPI 进行对比染色。

4.10 蛋白质序列比对

蛋白质序列比对是使用 EMBL-EBI 的 Clustal Omega 的多重序列比对方法进行的（https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/）。使用程序中的默认设置输入人 GT198、人 DNA 拓扑异构酶 I 和 IIB 的蛋白质序列进行比对。星号表示相同的氨基酸残基，圆点表示同源的氨基酸残基（补充图 2）。部分结果显示于图 3E。

4.11 统计学分析

统计分析用 GraphPad Prism 软件进行。条形图是由两个重复数据点得出，并显示为 DNA 结合活性。*P* 值使用非配对双尾 t-test 检验计算。* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001；NS，不显著。小于 0.05 的 *P* 值为有统计学意义的显著变化。

致谢

我们感谢美国国家癌症研究所 NCI，Division of Cancer Treatment and Diagnosis (DCTD), and Developmental Therapeutics Program (DTP) 提供的临床肿瘤药物集 VII 中的肿瘤药物板（4845 和 4846 板）。我们感谢匹兹堡大学的头颈癌 SPORE 提供的人类口腔肿瘤样本。我们感谢中国昆药集团公司药物研究所张伟博士和张建文博士提供的皂角刺提取物。我们感谢奥古斯塔大学的教师 Dorothy Tuan 博士提供的草药材料，Bal Lokeshwar 博士提供的 BIRM，以及 Ahmed Chadli 博士提供的药物材料。我们感谢以下摄影师提供的草药植物图片。美国夏威夷毛伊岛的 Forest Starr 和 Kim Starr 拍摄的多香果（Allspice，Pimenta dioica，图 5B）；德国 Niedersteinbach 的 Michael Wolf 拍摄的甘草（Glycyrrhiza uralensis，图 5B）。香港动植物公园，Li Yekting 拍摄的十大功劳（Mahonia oiwakensis，图 6B）；香港九龙，渔农自然护理署，香港植物标本室的降香（Dalbergia odorifera，图 6B）；Jordi Bosch Janer 和 David J Stang 在 Wikimedia Commons 上提供的 BIRM，Dulcamara 植物图片（Kalanchoe gastonis-bonnieri，图 6D）。

作者贡献

LK 和 JG 构思和设计了实验。LK, JP, JG, 和 LZ 进行了实验。JP，LZ 和 NFM 贡献了材料与试剂。LK 撰写手稿。所有作者对提交和发表的版本都最终批准。

资金来源

部分这项工作得到了佐治亚州癌症联盟杰出癌症学者奖（LK）的支持；和美国国立卫生研究院的资助（NFM, CA132640）。

利益冲突

作者柯蓝（Lan Ko）博士是美国 OnkoTarget 生物公司的创始人，也是 GT198 专利的发明人。其余作者声明，该研究是在没有任何商业关系的情况下进行，没有潜在的利益冲突。

领域贡献 (非专业语言描述)

血管增生是人类癌症的一个关键特征。肿瘤中小血管被激活导致细胞过度生长。为了开发抗癌药物，需要对肿瘤血管的蛋白靶点进行研究。在这里，我们验证了一种在血管干细胞上高表达的癌蛋白，发现是一个很好的药物靶标。我们首先测试了一百多种已经在临床使用过的抗癌化药，发现其中许多化药都能直接抑制该靶点。这些药物包括著名的化疗药物，如紫杉醇和多柔比星。这表明该癌蛋白是一个以前未被认知的药物靶点。这一发现解释了以前大量的药物疗效证据和临床治疗中的不足。我们接下来测试了一些抗癌草药，发现阳性草药都有在人类癌症治疗中的成功历史。我们进一步用有机化学方法部分纯化了一种阳性草药，并证明利用该靶点进行天然产物纯化的极大可行性。此项研究揭示了一个抗癌药物的新靶点，验证了多个化疗药物的新机制，为进一步药物开发提供了靶标，特别是可以从天然中草药中寻求低毒而高效的抗癌新药。

参考文献

1. Folkman, J. (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* **285**, 1182-1186
2. Carmeliet, P., and Jain, R. K. (2011) Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* **473**, 298-307
3. Plate, K. H., Scholz, A., and Dumont, D. J. (2012) Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy in malignant gliomas revisited. *Acta Neuropathol* **124**, 763-775
4. Sennino, B., and McDonald, D. M. (2012) Controlling escape from angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer* **12**, 699-709
5. Sandler, A., Gray, R., Perry, M. C., Brahmer, J., Schiller, J. H., Dowlati, A., Lilenbaum, R., and Johnson, D. H. (2006) Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* **355**, 2542-2550
6. Leslie, M. (2016) Tumors' do-it-yourself blood vessels. *Science* **352**, 1381-1383
7. Jain, R. K., and Carmeliet, P. (2012) SnapShot: Tumor angiogenesis. *Cell* **149**, 1408-1408 e1401
8. Takano, S. (2012) Glioblastoma angiogenesis: VEGF resistance solutions and new strategies based on molecular mechanisms of tumor vessel formation. *Brain Tumor Pathol* **29**, 73-86
9. Lugano, R., Ramachandran, M., and Dimberg, A. (2020) Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **77**, 1745-1770
10. Zhang, L., Wang, Y., Rashid, M. H., Liu, M., Angara, K., Mivechi, N. F., Maihle, N. J., Arbab, A. S., and Ko, L. (2017) Malignant pericytes expressing GT198 give rise to tumor cells through angiogenesis. *Oncotarget* **8**, 51591-51607
11. Armulik, A., Genove, G., and Betsholtz, C. (2011) Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell* **21**, 193-215
12. Papetti, M., and Herman, I. M. (2002) Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* **282**, C947-970
13. Bautch, V. L. (2011) Stem cells and the vasculature. *Nat Med* **17**, 1437-1443
14. Weller, M. (2010) Angiogenesis in glioblastoma: just another moving target? *Brain : a journal of neurology* **133**, 955-956
15. Farin, A., Suzuki, S. O., Weiker, M., Goldman, J. E., Bruce, J. N., and Canoll, P. (2006) Transplanted glioma cells migrate and proliferate on host brain vasculature: a dynamic analysis. *Glia* **53**, 799-808

16. Andonegui-Elguera, M. A., Alfaro-Mora, Y., Caceres-Gutierrez, R., Caro-Sanchez, C. H. S., Herrera, L. A., and Diaz-Chavez, J. (2020) An Overview of Vasculogenic Mimicry in Breast Cancer. *Frontiers in oncology* **10**, 220
17. Dunleavey, J. M., and Dudley, A. C. (2012) Vascular Mimicry: Concepts and Implications for Anti-Angiogenic Therapy. *Current angiogenesis* **1**, 133-138
18. Valle, I. B., Schuch, L. F., da Silva, J. M., Gala-Garcia, A., Diniz, I. M. A., Birbrair, A., Abreu, L. G., and Silva, T. A. (2020) Pericyte in Oral Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review. *Head and neck pathology* **14**, 1080-1091
19. Ribatti, D. (2007) The history of angiogenesis inhibitors. *Leukemia* **21**, 1606-1609
20. El-Kenawi, A. E., and El-Remessy, A. B. (2013) Angiogenesis inhibitors in cancer therapy: mechanistic perspective on classification and treatment rationales. *British journal of pharmacology* **170**, 712-729
21. Zirlik, K., and Duyster, J. (2018) Anti-Angiogenics: Current Situation and Future Perspectives. *Oncology research and treatment* **41**, 166-171
22. Cook, K. M., and Figg, W. D. (2010) Angiogenesis inhibitors: current strategies and future prospects. *CA: a cancer journal for clinicians* **60**, 222-243
23. Ko, L., Cardona, G. R., Henrion-Caude, A., and Chin, W. W. (2002) Identification and characterization of a tissue-specific coactivator, GT198, that interacts with the DNA-binding domains of nuclear receptors. *Mol Cell Biol* **22**, 357-369
24. Enomoto, R., Kinebuchi, T., Sato, M., Yagi, H., Shibata, T., Kurumizaka, H., and Yokoyama, S. (2004) Positive role of the mammalian TBPIP/HOP2 protein in DMC1-mediated homologous pairing. *J Biol Chem* **279**, 35263-35272
25. Pezza, R. J., Voloshin, O. N., Vanevski, F., and Camerini-Otero, R. D. (2007) Hop2/Mnd1 acts on two critical steps in Dmc1-promoted homologous pairing. *Genes Dev* **21**, 1758-1766
26. Satoh, T., Ishizuka, T., Tomaru, T., Yoshino, S., Nakajima, Y., Hashimoto, K., Shibusawa, N., Monden, T., Yamada, M., and Mori, M. (2009) Tat-binding protein-1 (TBP-1), an ATPase of 19S regulatory particles of the 26S proteasome, enhances androgen receptor function in cooperation with TBP-1-interacting protein/Hop2. *Endocrinology* **150**, 3283-3290
27. Peng, M., Bakker, J. L., DiCioccio, R. A., Gille, J. J. P., Zhao, H., Odunsi, K., Sucheston, L., Jaafar, L., Mivechi, N. F., Waisfisz, Q., and Ko, L. (2013) Inactivating mutations in GT198 in familial and early-onset breast and ovarian cancers. *Genes Cancer* **4**, 15-25
28. Schubert, S., Ripperger, T., Rood, M., Petkidis, A., Hofmann, W., Frye-Boukhriss, H., Tauscher, M., Auber, B., Hille-Betz, U., Illig, T., Schlegelberger, B., and Steinemann, D. (2017) GT198 (PSMC3IP) germline variants in early-onset breast cancer patients from hereditary breast and ovarian cancer families. *Genes Cancer* **8**, 472-483
29. Zangen, D., Kaufman, Y., Zeligson, S., Perlberg, S., Fridman, H., Kanaan, M., Abdulhadi-Atwan, M., Abu Libdeh, A., Gussow, A., Kisslov, I., Carmel, L., Renbaum, P., and Levy-Lahad, E. (2011) XX ovarian dysgenesis is caused by a PSMC3IP/HOP2 mutation that abolishes coactivation of estrogen-driven transcription. *Am J Hum Genet* **89**, 572-579
30. Yang, X., Touraine, P., Desai, S., Humphreys, G., Jiang, H., Yatsenko, A., and Rajkovic, A. (2019) Gene variants identified by whole-exome sequencing in 33 French women with premature ovarian insufficiency. *Journal of assisted reproduction and genetics* **36**, 39-45
31. Mei, L., Huang, L., Huang, Y., Wu, X., He, H., He, X., Su, Z., and Li, P. (2020) Two novel biallelic mutations in PSMC3IP in a Chinesepatient affected by primary ovarian insufficiency. *ResearchSquare preprint*, https://doi.org/10.21203/rs.21203.rs-33852/v21204
32. Al-Agha, A. E., Ahmed, I. A., Nuebel, E., Moriwaki, M., Moore, B., Peacock, K. A., Mosbruger, T., Neklason, D. W., Jorde, L. B., Yandell, M., and Welt, C. K. (2018) Primary Ovarian Insufficiency and Azoospermia in Carriers of a Homozygous PSMC3IP Stop Gain Mutation. *J Clin Endocrinol Metab* **103**, 555-563
33. Peng, M., Yang, Z., Zhang, H., Jaafar, L., Wang, G., Liu, M., Flores-Rozas, H., Xu, J., Mivechi, N. F., and Ko, L. (2013) GT198 splice variants display dominant negative activities and are induced by inactivating mutations. *Genes Cancer* **4**, 26-38

34. Yang, Z., Peng, M., Cheng, L., Jones, K., Maihle, N. J., Mivechi, N. F., and Ko, L. (2016) GT198 Expression Defines Mutant Tumor Stroma in Human Breast Cancer. *Am J Pathol* **186**, 1340-1350
35. Peng, M., Zhang, H., Jaafar, L., Risinger, J. I., Huang, S., Mivechi, N. F., and Ko, L. (2013) Human ovarian cancer stroma contains luteinized theca cells harboring tumor suppressor gene GT198 mutations. *J Biol Chem* **288**, 33387-33397
36. Zhang, L., Liu, Y., Cheng, L., Zhao, C., and Ko, L. (2019) Mutant GT198 in angiogenesis as a common origin of human prostate and bladder *BioRxiv*, https://doi.org/10.1101/726679
37. Achyut, B. R., Zhang, H., Angara, K., Mivechi, N. F., Arbab, A. S., and Ko, L. (2020) Oncoprotein GT198 vaccination delays tumor growth in MMTV-PyMT mice. *Cancer Lett* **476**, 57-66
38. Cho, N. W., Dilley, R. L., Lampson, M. A., and Greenberg, R. A. (2014) Interchromosomal homology searches drive directional ALT telomere movement and synapsis. *Cell* **159**, 108-121
39. Petukhova, G. V., Pezza, R. J., Vanevski, F., Ploquin, M., Masson, J. Y., and Camerini-Otero, R. D. (2005) The Hop2 and Mnd1 proteins act in concert with Rad51 and Dmc1 in meiotic recombination. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 449-453
40. Kelly, K., Pan, Z., Wood, M. E., Murphy, J., and Bunn, P. A., Jr. (1999) A phase I study of paclitaxel, etoposide, and cisplatin in extensive stage small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **5**, 3419-3424
41. Fisherman, J. S., McCabe, M., Noone, M., Ognibene, F. P., Goldspiel, B., Venzon, D. J., Cowan, K. H., and O'Shaughnessy, J. A. (1993) Phase I study of Taxol, doxorubicin, plus granulocyte-colony stimulating factor in patients with metastatic breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs* **15**, 189-194
42. Chatterjee, K., Zhang, J., Honbo, N., and Karliner, J. S. (2010) Doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiology* **115**, 155-162
43. Li, F., Jiang, T., Li, Q., and Ling, X. (2017) Camptothecin (CPT) and its derivatives are known to target topoisomerase I (Top1) as their mechanism of action: did we miss something in CPT analogue molecular targets for treating human disease such as cancer? *American journal of cancer research* **7**, 2350-2394
44. Posey, J. A., 3rd, Saif, M. W., Carlisle, R., Goetz, A., Rizzo, J., Stevenson, S., Rudoltz, M. S., Kwiatek, J., Simmons, P., Rowinsky, E. K., Takimoto, C. H., and Tolcher, A. W. (2005) Phase 1 study of weekly polyethylene glycol-camptothecin in patients with advanced solid tumors and lymphomas. *Clin Cancer Res* **11**, 7866-7871
45. Yang, Z., Gurvich, V. J., Gupta, M. L., Mivechi, N. F, Ko, L. . (2019) Oncoprotein GT198 is a direct target of taxol. *BioRxiv*, https://doi.org/10.1101/675579
46. Tewey, K. M., Rowe, T. C., Yang, L., Halligan, B. D., and Liu, L. F. (1984) Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science* **226**, 466-468
47. Pommier, Y. (2006) Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer* **6**, 789-802
48. Wu, C. C., Li, T. K., Farh, L., Lin, L. Y., Lin, T. S., Yu, Y. J., Yen, T. J., Chiang, C. W., and Chan, N. L. (2011) Structural basis of type II topoisomerase inhibition by the anticancer drug etoposide. *Science* **333**, 459-462
49. Zhang, L., Shamaladevi, N., Jayaprakasha, G. K., Patil, B. S., and Lokeshwar, B. L. (2015) Polyphenol-rich extract of Pimenta dioica berries (Allspice) kills breast cancer cells by autophagy and delays growth of triple negative breast cancer in athymic mice. *Oncotarget* **6**, 16379-16395
50. Dandekar, D. S., Lokeshwar, V. B., Cevallos-Arellano, E., Soloway, M. S., and Lokeshwar, B. L. (2003) An orally active Amazonian plant extract (BIRM) inhibits prostate cancer growth and metastasis. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **52**, 59-66
51. Shamaladevi, N., Araki, S., Lyn, D. A., Ayyathurai, R., Gao, J., Lokeshwar, V. B., Navarrete, H., and Lokeshwar, B. L. (2016) The andean anticancer herbal product BIRM causes

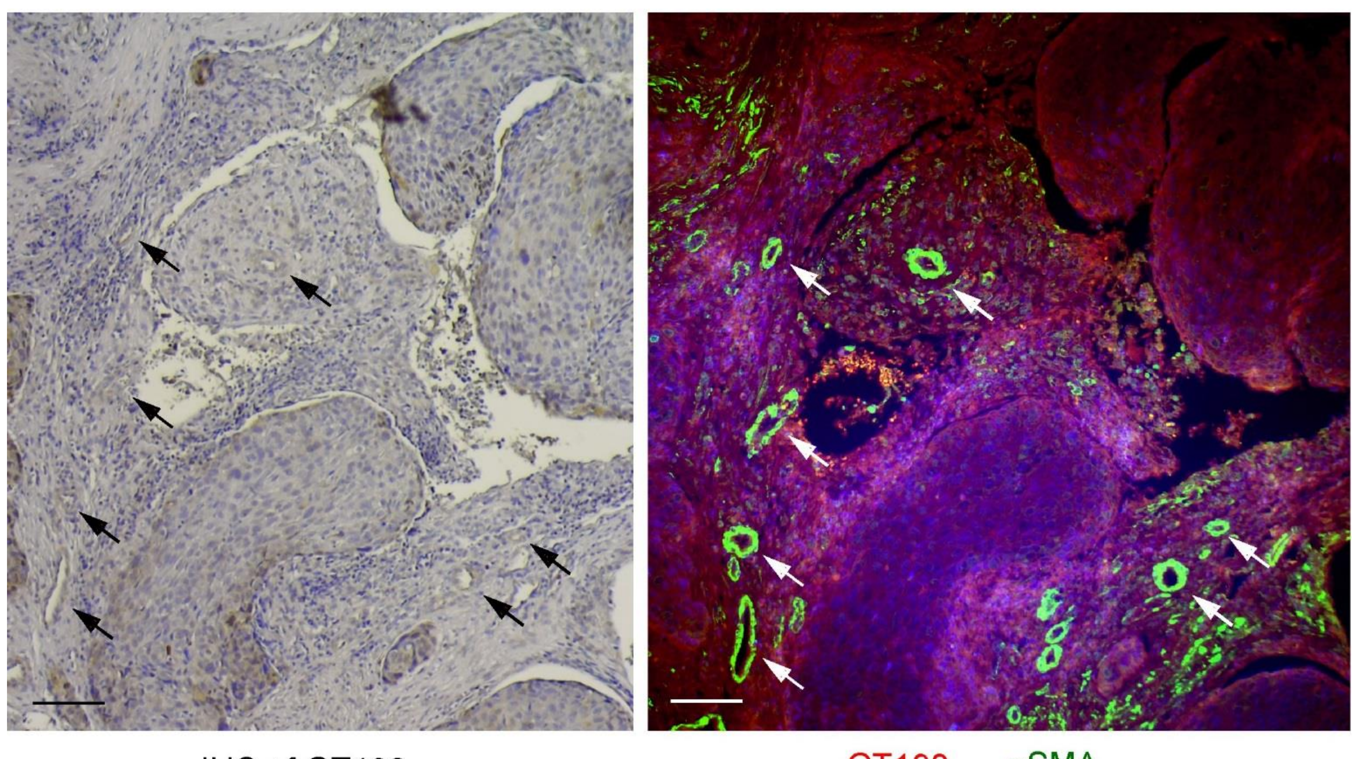
destabilization of androgen receptor and induces caspase-8 mediated-apoptosis in prostate cancer. *Oncotarget* **7**, 84201-84213
52. Li, W. H., Zhang, X. M., Tian, R. R., Zheng, Y. T., Zhao, W. M., and Qiu, M. H. (2007) A new anti-HIV lupane acid from Gleditsia sinensis Lam. *Journal of Asian natural products research* **9**, 551-555
53. Rommens, J. M., Durocher, F., McArthur, J., Tonin, P., LeBlanc, J. F., Allen, T., Samson, C., Ferri, L., Narod, S., Morgan, K., and et al. (1995) Generation of a transcription map at the HSD17B locus centromeric to BRCA1 at 17q21. *Genomics* **28**, 530-542
54. Ijichi, H., Tanaka, T., Nakamura, T., Yagi, H., Hakuba, A., and Sato, M. (2000) Molecular cloning and characterization of a human homologue of TBPIP, a BRCA1 locus-related gene. *Gene* **248**, 99-107
55. Petukhova, G. V., Romanienko, P. J., and Camerini-Otero, R. D. (2003) The Hop2 protein has a direct role in promoting interhomolog interactions during mouse meiosis. *Dev Cell* **5**, 927-936
56. Sansam, C. L., and Pezza, R. J. (2015) Connecting by breaking and repairing: mechanisms of DNA strand exchange in meiotic recombination. *FEBS J* **282**, 2444-2457
57. Ko, L. (2019) Human solid cancer decoded. *Zenodo preprint*, http://doi.org/10.5281/zenodo.3236836
58. Lennernas, B., Albertsson, P., Lennernas, H., and Norrby, K. (2003) Chemotherapy and antiangiogenesis--drug-specific, dose-related effects. *Acta oncologica* **42**, 294-303
59. Panigrahy, D., Kaipainen, A., Butterfield, C. E., Chaponis, D. M., Laforme, A. M., Folkman, J., and Kieran, M. W. (2010) Inhibition of tumor angiogenesis by oral etoposide. *Experimental and therapeutic medicine* **1**, 739-746
60. Clements, M. K., Jones, C. B., Cumming, M., and Daoud, S. S. (1999) Antiangiogenic potential of camptothecin and topotecan. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **44**, 411-416
61. Sobell, H. M. (1985) Actinomycin and DNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 5328-5331
62. Wang, J., Lou, P., Lesniewski, R., and Henkin, J. (2003) Paclitaxel at ultra low concentrations inhibits angiogenesis without affecting cellular microtubule assembly. *Anticancer Drugs* **14**, 13-19
63. Kumar, K., Ghanghas, P., and Sanyal, S. N. (2018) Chemopreventive action of Imatinib, a tyrosine kinase inhibitor in the regulation of angiogenesis and apoptosis in rat model of lung cancer. *Molecular and cellular biochemistry* **447**, 47-61
64. Mercea, P. A., Mischkulnig, M., Kiesel, B., Wadiura, L. I., Roetzer, T., Prihoda, R., Heicappell, P., Kreminger, J., Furtner, J., Woehrer, A., Preusser, M., Roessler, K., Berghoff, A. S., and Widhalm, G. (2021) Prognostic Value of 5-ALA Fluorescence, Tumor Cell Infiltration and Angiogenesis in the Peritumoral Brain Tissue of Brain Metastases. *Cancers (Basel)* **13**, 604
65. Gao, Y., Zhou, S., Pang, L., Yang, J., Li, H. J., Huo, X., and Qian, S. Y. (2019) Celastrol suppresses nitric oxide synthases and the angiogenesis pathway in colorectal cancer. *Free radical research* **53**, 324-334
66. Chevallier, A. (2016) *Encyclopedia of Herbal Medicine*, Dorling Kindersley Limited, London UK
67. Zheng, J. (2014) [Preliminary textual research on Zhijintang Sanctum re-revised version of Jinling edition of Ben cao gang mu (Compendium of Materia Medica)]. *Zhonghua yi shi za zhi* **44**, 106-110
68. Shoemaker, M., Hamilton, B., Dairkee, S. H., Cohen, I., and Campbell, M. J. (2005) In vitro anticancer activity of twelve Chinese medicinal herbs. *Phytother Res* **19**, 649-651
69. Ryu, S., Park, K. M., and Lee, S. H. (2016) Gleditsia sinensis Thorn Attenuates the Collagen-Based Migration of PC3 Prostate Cancer Cells through the Suppression of alpha2beta1 Integrin Expression. *Int J Mol Sci* **17**, 328

70. Lee, J., Yi, J. M., Kim, H., Lee, Y. J., Park, J. S., Bang, O. S., and Kim, N. S. (2014) Cytochalasin H, an active anti-angiogenic constituent of the ethanol extract of Gleditsia sinensis thorns. *Biol Pharm Bull* **37**, 6-12
71. Yi, J. M., Park, J. S., Oh, S. M., Lee, J., Kim, J., Oh, D. S., Bang, O. S., and Kim, N. S. (2012) Ethanol extract of Gleditsia sinensis thorn suppresses angiogenesis in vitro and in vivo. *BMC Complement Altern Med* **12**, 243
72. Gao, J., Yang, X., and Yin, W. (2016) From Traditional Usage to Pharmacological Evidence: A Systematic Mini-Review of Spina Gleditsiae. *Evid Based Complement Alternat Med* **2016**, 3898957
73. Shamaladevi, N., Lyn, D. A., Shaaban, K. A., Zhang, L., Villate, S., Rohr, J., and Lokeshwar, B. L. (2013) Ericifolin: a novel antitumor compound from allspice that silences androgen receptor in prostate cancer. *Carcinogenesis* **34**, 1822-1832
74. Zhang, L., and Lokeshwar, B. L. (2012) Medicinal properties of the Jamaican pepper plant Pimenta dioica and Allspice. *Current drug targets* **13**, 1900-1906



Supplementary Material

Article Title: GT198 Is a Target of Oncology Drugs and Anticancer Herbs



Supplementary Figure 1. Angiogenic blood vessel-derived human oral tumor. Extended view of Figure 1D. Adjacent human oral tumor sections were immunohistochemical stained with GT198 (left panel), and fluorescent doubled stained with GT198 in red and αSMA in green (right panel). Arrows indicate GT198^{+} and αSMA^{+} blood vessels. Angiogenic vessels are initially located in the stroma. When tumors develop surrounding the vessels, blood vessels disintegrate and αSMA^{+} cells become scattered into the new growth of tumor. In contrast, the advanced tumors have a few diluted αSMA^{+} cells (lower center and upper right areas). Scale bars = 100 μm.

Clinical staging of human oral cancer FFPE specimens:

1) Male, age 56, Normal oral mucosa, Figure 1B, quiescent vessel.
2) Male, age 50, T4N3M0, Figure 1B, angiogenic vessel.
3) Male, age 53, T3N2M0, Figure 1B, detached pericytes.
4) Male, age 65, T2N1M0, Figure 1B, vessel in tumor.
5) Male, age 51, T3N1M0, adjacent tissue in Figure 1C; tumor in Figure 1D and in Supplementary Figure 1.



Supplementary Figure 2. Protein sequence alignment of human GT198, human DNA topoisomerase I (Top1), and IIB (Top2B) using Clustal Omega at EMBL-EBI. Asterisks denote identical amino acid residues and dots denote homologous residues.

```
CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

Top2B           MAKSGGCGAGAGVGGGNGALTWVNNAAKKEESETANKNDSSKKLSVERVYQKKTQLEHIL 60
GT198           ------------------------------------------------------------ 0
Top1            ------------------------------------------------------------ 0

Top2B           LRPDTYIGSVEPLTQFMWVYDEDVGMNCREVTFVPGLYKIFDEILVNAADNKQRDKNMTC 120
GT198           ------------------------------------------------------------ 0
Top1            ------------------------------------------------------------ 0

Top2B           IKVSIDPESNIISIWNNGKGIPVVEHKVEKVYVPALIFGQLLTSSNYDDDEKKVTGGRNG 180
GT198           ------------------------------------------------------------ 0
Top1            ------------------------------------------------------------ 0

Top2B           YGAKLCNIFSTKFTVETACKEYKHSFKQTWMNNMMKTSEAKIKHFDGEDYTCITFQPDLS 240
GT198           ------------------------------------------------------------ 0
Top1            ------------------------------------------------------------ 0

Top2B           KFKMEKLDKDIVALMTRRAYDLAGSCRGVKVMFNGKKLPVNGFRSYVDLYVKDKLDETGV 300
GT198           ------------------------------------------------------------ 0
Top1            ------------------------------------------------------------ 0

Top2B           ALKVIHELANERWDVCLTLSEKGFQQISFVNSIATTKGGRHVDYVVDQVVGKLIEVVKKK 360
GT198           ------------------------------------------------------------ 0
Top1            ------------------------------------MSGDH------------------- 5

Top2B           NKAGVSVKPFQVKNHIWVFINCLIENPTFDSQTKENMTLQPKSFGSKCQLSEKFFKAASN 420
GT198           ------------------------------------------------------------ 0
Top1            -------------------------------------------LHNDSQIEADFRLNDSH 22

Top2B           CGIVESILNWVKFKAQTQLNKKCSSVKYSKIKGIPKLDDANDAGGKHSLECTLILTEGDS 480
GT198           ------------------------------------------------------------ 0
Top1            -------KHKDKHKDREHRHKEHKKEK-DREKSKHSNSEHKDSEKKHKEKEKTKHKDGSS 74

Top2B           ----------------AKSLAVSGLGVIGRDRYGVFPLRGKILNVREASHKQIMENAEIN 524
GT198           ------------------------------------------------------------ 0
Top1            EKHKDKHKDRDKEKRKEEKVRASGDAKIKKEKENGFSSPPQIKDEPEDDGYFVPPKEDIK 134

Top2B           NIIKI---VGLQYKKSYDD--------AESLKTLRYGKIMIMTDQDQDGS-------HI- 565
GT198           ------------------------------------------------------------ 0
Top1            PLKRPRDEDDADYKPKKIKTEDTKKEKKRKLEEEEDGKLKKPKNKDKDKKVPEPDNKKKK 194

Top2B           -----KGLLINFIHHNWPSLLKHGFLEEFITPIVKASKNKQELSFYSIPEFDEWKKHIEN 620
GT198           ------------------------------------------------------------ 0
Top1            PKKEEEQKWKWWEEERYPEGIKWKFLEHKG-PVFAP-------PYEPLPEN--------- 237

Top2B           QKAWKIKYYKGLGT---STAKEAKEYFADMERHRILFRYAGPEDDAAITLAFSKKKIDDR 677
GT198           ------------------------------------------------------------ 0
Top1            ----VKFYYDGKVMKLSPKAEEVATFFAKMLDHEY----------------------TTK 271

Top2B           KEWLTNFMEDRRQRRLHGLPEQFLYGTATKHLTYNDFINKELILFSNSDNERSIPSLVDG 737
GT198           ------------------------------------------------------------ 0
Top1            EIFRKNFFKDWRKEMTNE-EKNII-----TNLSKCDFTQMSQY-FKAQTEARKQMSKEEK 324

Top2B           FK--PGQR---KVLFTCFKRNDKREVKVAQLAGSVAEMSAYHHGEQALMMTIVNLAQNFV 792
GT198           ------------------------------------------------------------ 0
Top1            LKIKEENEKLLKEYGFCIMDNHKERI---------------------------------- 350

Top2B           GSNNINLLQPIGQFGTRLHGGKDAA-----SPRYIFTMLSTLARLLFPAVDDNLLKFLYD 847
GT198           ------------------------------------------------------------ 0
Top1            ---ANFKIEPPGLFRGRGNHPKMGMLKRRIMPEDIIINCSKDAKVPSPPPGHKWKEVRHD 407

Top2B           DNQRVEPEWYI-------------PIIPMVLINGAEGIGTGWACKLPNYDAREIVNNVRR 894
GT198           ------------------------------------------------------------ 0
Top1            ----NKVTWLVSWTENIQGSIKYIMLNPSSRIKGE----KDWQKYETARRLKKCVDKIRN 459

Top2B           MLDGLDPHPMLPNYKNFKGTIQELGQNQYAVSGEIFVVDRNTVEI--------TELPVRT 946
GT198           ------------------------------------------------MSKGRAEAAAGA 12
Top1            QY--------RED---WKSKEMKVRQ--RA--VALYFIDKLALRAGNEKEEGETADTVGC 504
                                                                     :   .

Top2B           WTQVYKEQVLEPMLNGTDKTPALISDYKEYHTDTTVKFVVKMTEEKLAQAEAAGLHKVFK 1006
GT198           AGILLR-----------------------YLQEQNRPY-----SS----------QDVFG 34
Top1            CSLRVEHINLHPELDGQEYVV----EF-DFLGKDSIRYYNKVPVE----------KRVFK 549
                     .                       : . .   :      .          : **

Top2B           LQTTLT---CNSMVLFDHMGCLKKYETVQDILK------EFFDLRLSYYGLRKEWLVGML 1057
GT198           NLQR-------EHG----LGKAVVVKTLEQLAQQGKIKEKMYGKQKIYFADQDQF--DMV 81
Top1            NLQLFMENKQPEDDLFDRLNTGILNKHLQDLME--GLTAKVFRTYNASITLQQQL--KEL 605
                           .      :.     : :::: :      :.:         :.:     :

Top2B           GAESTKLNNQARFILEKIQGKITIENRSKKDLIQMLVQRGYESDPVKAWKEAQEKAAEED 1117
GT198           S----------DADLQVLDGKIVALTAKVQSLQQS---CRYMEAELKELSSALT------ 122
Top1            T----------APDE-NIPAKILSYNRANRAVAIL---CNHQRAPPKTFEKSM------- 644
                                 : .**   .   : :        :     *  ..:

Top2B           ETQNQHDDSSSDSGTPSGPDFNYILNMSLWSLTKEKVEELIKQR------DAKGREVNDL 1171
GT198           -------------------------TPEMQKEIQELKKECAGYRERLKNIKAATNHVT-- 155
Top1            --------------------------MNLQTKIDAKKEQLADARRDLKSAKADAKVMKDA 678
                                           .: .  .   ::    *      .* .  :.

Top2B           KRKSPSDLWKEDLAAFVEELDKVE-----SQEREDVLAGMSG---------KAIKGKVGK 1217
GT198           -----------------------------PEEK-----------EQVYRERQKYCKEWRK 175
Top1            KTKKVVESKKKAVQRLEEQLMKLEVQATDREENKQIALGTSKLNYLDPRITVAWCKKWGV 738
                                              :*.                       :

Top2B           PKVKKLQLEETMPSPYGRRIIPEITAMKADASKKLLKKKKGDLDTAAVKVEFDEEFSGAP 1277
GT198           RKRMATELSDAILEGYP------------------------------------------- 192
Top1            PIEK----------IYN------------------------------------------- 745
                               *

Top2B           VEGAGEEALTPSVPINKGPKPKREKKEPGTRVRKTPTSSGKPSAKKVKKRNPWSDDESKS 1337
GT198           --------------------------------------------KSKKQFFEEVGIETDE 208
Top1            --------------------------------------------KTQREKFAWAIDMADE 761
                                                            *. ::        :..

Top2B           ESDLEETEPVVIPRDSLLRRAAAERPKYTFDFSEEEDDDADDDDDDNNDLEELKVKASPI 1397
GT198           DYNVTLPDP--------------------------------------------------- 217
Top1            DYEF-------------------------------------------------------- 765
                : :.

Top2B           TNDGEDEFVPSDGLDKDEYTFSPGKSKATPEKSLHDKKSQDFGNLFSFPSYSQKSEDDSA 1457
GT198           ------------------------------------------------------------ 217
Top1            ------------------------------------------------------------ 765

Top2B           KFDSNEEDSASVFSPSFGLKQTDKVPSKTVAAKKGKPSSDTVPKPKRAPKQKKVVEAVNS 1517
GT198           ------------------------------------------------------------ 217
Top1            ------------------------------------------------------------ 765

Top2B           DSDSEFGIPKKTTTPKGKGRGAKKRKASGSENEGDYNPGRKTSKTTSKKPKKTSFDQDSD 1577
GT198           ------------------------------------------------------------ 217
Top1            ------------------------------------------------------------ 765

Top2B           VDIFPSDFPTEPPSLPRTGRARKEVKYFAESDEEEDDVDFAMFN 1621
GT198           -------------------------------------------- 217
Top1            -------------------------------------------- 765
```



Supplementary Table 1. Identification of GT198 inhibitors from 129 clinical oncology drugs. The FDA Approved Oncology Drug Set VII from NCI, Plate 4845 and Plate 4846, were tested using the DNA-binding assay for direct inhibition of GT198. Available IC_{50} values and efficacies (percent of inhibition at 2 µM of drugs) are shown. -, not active; +, active; ND, not detectable.

Inhibition of GT198 (NCI Approved Oncology Drug Set VII)								
Plate	Well ID	Compound ID	CAS Number	Drug Name	MW	Activity	IC50	Efficacy (2 µM)
4845	A02	1390	315-30-0	Allopurinol	136.11	–		
4845	B02	19893	51-21-8	Fluorouracil	130.08	–		
4845	C02	32065	127-07-1	Hydroxyurea	76.05	–		
4845	D02	752	154-42-7	Thioguanine	167.19	–		
4845	E02	755	50-44-2	Mercaptopurine	152.18	–		
4845	F02	762	55-86-7	Mechlorethamine	192.52	–		
4845	G02	6396	52-24-4	Thiotepa	189.22	–		
4845	H02	18509	5451-09-2	Aminolevulinic acid	167.59	+		
4845	A03	45388	4342-03-4	Dacarbazine	182.18	–		
4845	B03	362856	85622-93-1	Temozolomide	194.15	–		
4845	C03	750	55-98-1	Busulfan	246.30	–		
4845	D03	13875	645-05-6	Altretamine	210.28	–		
4845	E03	27640	50-91-9	Floxuridine	246.19	–		
4845	F03	45923	298-81-7	Methoxsalen	216.19	–		
4845	G03	79037	13010-47-4	Lomustine	233.70	–		
4845	H03	102816	320-67-2	Azacitidine	244.21	–		
4845	A04	127716	2353-33-5	Decitabine	228.21	–		
4845	B04	296961	20537-88-6	Amifostine	214.22	–		
4845	C04	409962	154-93-8	Carmustine	214.05	–		
4845	D04	26271	6055-19-2	Cyclophosphamide	261.09	–		
4845	E04	34462	66-75-1	Uracil mustard	252.10	–		
4845	F04	63878	69-74-9	Cytarabine	279.70	–		
4845	G04	66847	50-35-1	Thalidomide	258.23	–		
4845	H04	75520	70-00-8	Trifluridine	296.20	+		
4845	A05	77213	366-70-1	Procarbazine	257.76	–		
4845	B05	85998	18883-66-4	Streptozocin	265.22	–		
4845	C05	105014	4291-63-8	Cladribine	285.69	–		
4845	D05	109724	3778-73-2	Ifosfamide	261.09	–		
4845	E05	119875	15663-27-1	Cisplatin	300.06	–		
4845	F05	122758	302-79-4	Tretinoin	300.44	–		
4845	G05	169780	24584-09-6	Dexrazoxane	268.27	–		
4845	H05	218321	53910-25-1	Pentostatin	268.27	–		
4845	A06	613327	122111-03-9	Gemcitabine	299.65	–		
4845	B06	701852	149647-78-9	Vorinostat	264.32	–		
4845	C06	713563	107868-30-4	Exemestane	296.40	–		
4845	D06	719344	120511-73-1	Anastrozole	293.37	–		
4845	E06	719345	112809-51-5	Letrozole	285.30	–		
4845	F06	721517	118072-93-8	Zoledronic acid	272.09	–		



4845	G06	747972	191732-72-6	Lenalidomide	259.26	—		
4845	H06	755985	121032-29-9	Nelarabine	297.27	—		
4845	A07	775351	19171-19-8	Pomalidomide	273.25	—		
4845	B07	3088	305-03-3	Chlorambucil	304.22	—		
4845	C07	26980	50-07-7	Mitomycin	334.33	—		
4845	D07	38721	53-19-0	Mitotane	320.04	—		
4845	E07	606869	123318-82-1	Clofarabine	303.68	—		
4845	F07	758774	414864-00-9	Belinostat	318.35	—		
4845	G07	761190	404950-80-7	Panobinostat	349.43	—		
4845	H07	25154	54-91-1	Pipobroman	356.06	—		
4845	A08	71423	595-33-5	Megestrol acetate	384.51	—		
4845	B08	138783	3543-75-7	Bendamustine	394.73	—		
4845	C08	241240	41575-94-4	Carboplatin	371.25	—	ND	0%
4845	D08	266046	61825-94-3	Oxaliplatin	397.29	—		
4845	E08	312887	75607-67-9	Fludarabine	365.21	—		
4845	F08	712807	154361-50-9	Capecitabine	359.35	—		
4845	G08	719627	169590-42-5	Celecoxib	381.37	—		
4845	H08	750690	557795-19-4	Sunitinib	398.47	+		
4845	A09	756655	179324-69-7	Bortezomib	384.24	—		
4845	B09	757441	319460-85-0	Axitinib	386.47	—		
4845	C09	279836	65271-80-9	Mitoxantrone	444.49	+	187 nM	90%
4845	D09	715055	184475-35-2	Gefitinib	446.90	—		
4845	E09	718781	183319-69-9	Erlotinib	429.90	—		
4845	F09	753686	763113-22-0	Olaparib	434.46	—		
4845	G09	755980	417716-92-8	Lenvatinib	426.86	—		
4845	H09	755986	879085-55-9	Vismodegib	421.30	—		
4845	A10	756645	877399-52-5	Crizotinib	450.34	—		
4845	B10	759224	870281-82-6	Idelalisib	415.42	—		
4845	C10	761910	936563-96-1	Ibrutinib	440.50	—		
4845	D10	740	59-05-2	Methotrexate	454.44	—		
4845	E10	609699	119413-54-6	Topotecan	457.91	—	>2 μM	4%
4845	F10	732517	863127-77-9	Dasatinib	488.01	—		
4845	G10	737754	635702-64-6	Pazopanib	473.98	—		
4845	H10	743414	152459-95-5	Imatinib	493.61	+		
4845	A11	747971	284461-73-0	Sorafenib	464.82	—		
4845	B11	747974	84449-90-1	Raloxifene	473.59	—		
4845	C11	750691	439081-18-2	Afatinib	485.94	—		
4845	D11	754230	146464-95-1	Pralatrexate	477.48	—		
4845	E11	755384	357166-30-4	Pemetrexed	471.38	—		
4845	F11	755605	915087-33-1	Enzalutamide	464.42	—		
4845	G11	760766	443913-73-3	Vandetanib	475.36	—		
4845	H11	761385	956697-53-3	Erismodegib	485.49	—		



4845	G06	747972	191732-72-6	Lenalidomide	259.26	–		
4845	H06	755985	121032-29-9	Nelarabine	297.27	–		
4845	A07	775351	19171-19-8	Pomalidomide	273.25	–		
4845	B07	3088	305-03-3	Chlorambucil	304.22	–		
4845	C07	26980	50-07-7	Mitomycin	334.33	–		
4845	D07	38721	53-19-0	Mitotane	320.04	–		
4845	E07	606869	123318-82-1	Clofarabine	303.68	–		
4845	F07	758774	414864-00-9	Belinostat	318.35	–		
4845	G07	761190	404950-80-7	Panobinostat	349.43	–		
4845	H07	25154	54-91-1	Pipobroman	356.06	–		
4845	A08	71423	595-33-5	Megestrol acetate	384.51	–		
4845	B08	138783	3543-75-7	Bendamustine	394.73	–		
4845	C08	241240	41575-94-4	Carboplatin	371.25	–	ND	0%
4845	D08	266046	61825-94-3	Oxaliplatin	397.29	–		
4845	E08	312887	75607-67-9	Fludarabine	365.21	–		
4845	F08	712807	154361-50-9	Capecitabine	359.35	–		
4845	G08	719627	169590-42-5	Celecoxib	381.37	–		
4845	H08	750690	557795-19-4	Sunitinib	398.47	+		
4845	A09	756655	179324-69-7	Bortezomib	384.24	–		
4845	B09	757441	319460-85-0	Axitinib	386.47	–		
4845	C09	279836	65271-80-9	Mitoxantrone	444.49	+	187 nM	90%
4845	D09	715055	184475-35-2	Gefitinib	446.90	–		
4845	E09	718781	183319-69-9	Erlotinib	429.90	–		
4845	F09	753686	763113-22-0	Olaparib	434.46	–		
4845	G09	755980	417716-92-8	Lenvatinib	426.86	–		
4845	H09	755986	879085-55-9	Vismodegib	421.30	–		
4845	A10	756645	877399-52-5	Crizotinib	450.34	–		
4845	B10	759224	870281-82-6	Idelalisib	415.42	–		
4845	C10	761910	936563-96-1	Ibrutinib	440.50	–		
4845	D10	740	59-05-2	Methotrexate	454.44	–		
4845	E10	609699	119413-54-6	Topotecan	457.91	–	>2 μM	4%
4845	F10	732517	863127-77-9	Dasatinib	488.01	–		
4845	G10	737754	635702-64-6	Pazopanib	473.98	–		
4845	H10	743414	152459-95-5	Imatinib	493.61	+		
4845	A11	747971	284461-73-0	Sorafenib	464.82	–		
4845	B11	747974	84449-90-1	Raloxifene	473.59	–		
4845	C11	750691	439081-18-2	Afatinib	485.94	–		
4845	D11	754230	146464-95-1	Pralatrexate	477.48	–		
4845	E11	755384	357166-30-4	Pemetrexed	471.38	–		
4845	F11	755605	915087-33-1	Enzalutamide	464.42	–		
4845	G11	760766	443913-73-3	Vandetanib	475.36	–		
4845	H11	761385	956697-53-3	Erismodegib	485.49	–		